Zur Struktur und Heterogenität des Rinderleberkatalasemoleküls: Konformationsänderungen der Untereinheiten

GÜNTER KUNTZ

MÜNCHEN
1972

Zur Struktur und Heterogenität des Rinderleberkatalasemoleküls: Konformationsänderungen der Untereinheiten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Günter Kuntz
aus
München

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Professor Dr. Theodor Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 10. 1972

Meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1969 bis Februar 1972 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

danke ich herzlich für das erwiesene Entgegenkommen und sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Kurt Hannig

bin ich für die Ermöglichung und Förderung der vorliegenden Arbeit, sowie für die Bereitstellung von Institutsmitteln zu großem Dank verpflichtet.

Für ständige Unterstützung, seine Anregungen und die ausgezeichnete Anleitung bei vielen der durchgeführten biochemischen Untersuchungen möchte ich

Herrn Dr. Hans Georg Heidrich

besonders danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Priv. Doz. Dr. A. Mayer für die Meßmöglichkeit an der Röntgenkleinwinkelstreuanlage der TU München und Herrn cand. rer. nat. G. Keller für die freundliche Hilfe bei den Messungen und für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen IV
Verzeichnis der verwendeten Symbole V
1 Einleitung 1
11 Allgemeines über Katalase 1
12 Heterogenität von Katalase 3
13 Problemstellung 5
2 Material 7
21 Rinderleberkatalase 7
22 Chemikalien 7
3 Biochemische Präparations- und Analysenmethoden 7
31 Darstellung von Rinderleberkatalasen 7
311 Isolierung von Katalase aus Rinderleber 7
312 Darstellung von Kat1 und Kat5 8
32 Elektrophoretische Methoden 9
321 Discelektrophoresen 9
3211 Discelektrophorese von Katalase im nativen Zustand 9
3212 Discelektrophorese in Anwesenheit von 8 M Harnstoff 10
3213 SDS-Discelektrophoresen 11
322 Isoelektrische Fokussierung 12
323 Trägerfreie Elektrophorese 13
3231 Qualitative Betrachtungen 13
32311 Die elektrische Aufladung von Oberflächen 13
32312 Die elektrische Doppelschicht 14
3232 Quantitative Betrachtungen 16
3233 Zusammenstellung aller für die Ermittlung der Teilchennettoladung notwendigen Größen 19
3234 Die Elektrophoreseapparatur 22
324 Chemische Charakterisierungsmethoden 22
3241 Stickstoffbestimmung 22
3242 Bestimmung der Konzentration von Kat1 und Kat5 23
3243 Kohlehydratanalyse 24
3244 Lipidanalyse 25
3245 Analyse primärer Aminogruppen 25
3246 Bestimmung der Sulfhydrylgruppen 26
3247 Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide von Kat1 und Kat5 28

3248 Aminosäureanalyse 28
3249 Gelfiltration in Anwesenheit von 8 M Harnstoff 29
32410 Hybridisierung von Kat1 mit Kat5 31
4 Biophysikalische Methoden 31
41 Optische Methoden 31
411 Meßgrößen 31
412 ∝ -Helixgehalt 32
413 Spektrophotometrische Titration zur Bestimmung der "freien" und "verborgenen" Tyrosinreste..... 33
414 Spektroskopische Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan..... 34
415 Spektroskopische Geräte 34
42 Röntgenkleinwinkelstreuung..... 35
421 Einleitung..... 35
422 Streuverhalten dreiachsiger Körper endlicher Dimension..... 35
423 Volumenberechnung 38
424 Die Röntgenkleinwinkelstreuanlage 39
4241 Energie- und Kameraanlage 39
4242 Justierung der Blendensysteme 40
425 Entschmierung 42
4251 Allgemeines 42
4252 Das Spalthöhenkorrekturprogramm nach Hossfeld 43
43 Elektronenmikroskopie 43
5 Ergebnisse 45
51 Biochemische Charakterisierung von Kat1 und Kat5... 45
511 Elektrophoretische Eigenschaften im nativen Zustand 45
5111 Discelektrophorese der an DEAE-Sephadex chromatographierten Katalase 45
5112 Isoelektrische Punkte von Kat1 und Kat5 47
5113 Bestimmung der Oberflächennettoladungen von Kat1 und Kat5 mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese... 48
512 Elektrophoretische Eigenschaften im denaturierten Zustand 51
5121 Discelektrophorese in Anwesenheit von 8 M Harnstoff. 51
5122 Molekulargewichtsbestimmung der Katalaseuntereinheiten mittels SDS-Elektrophorese 53
5123 SDS-induzierte Spaltung von Katalase in Abwesenheit eines Reduktionsmittels..... 56

513 Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten durch Gelfiltration 57
514 Auftrennung der tryptischen Peptide von Kat1 u. Kat5.... 59
515 Aminosäureanalyse 59
516 Bestimmung von Sulfhydrylgruppen 62
517 Analyse primärer Aminogruppen 63
518 Hybridisierung 63
519 Kohlehydrat-Analyse 64
52 Biophysikalische Charakterisierung von Kat1 und Kat5.... 66
521 Absorptionsspektren 66
522 Tyrosin-Titration 67
523 ORD- und CD-Spektren 69
524 Abschätzung des α-Helixgehaltes 70
525 Röntgenkleinwinkelmessungen 71
5251 Vorbereitung der Meßlösungen 71
5252 Direkt gemessene Streukurven 72
5253 Entschmierte Streukurven 74
5254 Porodsche Invarianten 76
5255 Volumenbestimmung 78
52551 Aus der Porodschen Invariante 78
52552 Durch Vergleich mit Oxy-Hb 78
5256 Ermittlung der Form der Katalasemoleküle 79
52561 Anisotropiefaktoren 79
52562 Vergleich mit theoretischen Streukurven 80
526 Elektronenmikroskopie 84
6 Diskussion 86
61 Chromatographische und elektrophoretische Unterschiede zwischen Kat1 und Kat5 86
62 Untersuchungen zur Primärstruktur von Kat1 und Kat5 88
63 Konformationsunterschiede zwischen Kat1 und Kat5..... 91
64 Folgerungen aus den erzielten Ergebnissen zu Struktur, Form und Heterogenität des Rinderleberkatalasemoleküls.. 96
7 Zusammenfassung.....100
Literaturverzeichnis 103
Lebenslauf 110

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1)
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
CD	Circulardichroismus
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol (Clelands Reagenz)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
Gu·HCl	Guanidinhydrochlorid
HMDS	Hexamethyldisilazan
IP	Isoelektrischer Punkt
LDH	Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27)
ORD	Optische Rotationsdispersion
Oxy-Hb	Oxigeniertes Humanhämoglobin
RkWS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TMS	Trimethylchlorsilan
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

Verzeichnis der verwendeten Symbole

a	Radius eines Proteinmoleküls in Å
a	Abstand Registrierebene - streuendes Präparat in cm (RkWS)
a_1	Partikelradius der Elektrolytionen eines Puffers in Å
b	Kammerbreite in cm
c	Konzentration in Mol/l
c'	Konzentration in Gewichtsprozenten
c_e	Molkonzentration der Elektrolytionen eines Puffers
d	Küvettenschichtdicke in cm oder dm
e	Elementarladung
E	Extinktion
g	Erdbeschleunigung
G	Geometriefaktor der Trennkammer
h	Winkelvariable in $Å^{-1}$
H	Feldstärke
I	Lichtintensität
I	Streuung in willkürlichen Intensitätseinheiten (entschmierte Streukurve) (RkWS)
$\tilde{I}$	Streuung in willkürlichen Intensitätseinheiten (verschmierte Streukurve) (RkWS)
M	Molekulargewicht
$\bar{M}$	Mittleres Aminosäurerestgewicht
n	Brechungsindex
N	Loschmidtsche Zahl
$\bar{q}$	Scheinbare Teilchennettoladung
q	Tatsächliche Teilchennettoladung
Q	Porodsche Invariante (entschmierte Streukurve)
$\tilde{Q}$	Porodsche Invariante (verschmierte Streukurve)
r	Radius einer Kugel oder eines Kreises in Å
R_s	Streumassenradius in Å
$[R]$	Molare Drehung in Grad cm^2/Dezimol in Lösung
$[R']$	Molare Drehung im Vakuum
s	Elektrophoretische Ablenkung in cm
s	Abstand Meßpunkt - Primärstrahlschwerpunkt in cm (RkWS)
t	Zeit in Sekunden oder Minuten
u_e	Elektrophoretische Beweglichkeit

u_i	Spalthöhen
v	Elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit
V	Volumen
V_o	Ausschlußvolumen
V_e	Elutionsvolumen
∇	Kehrwert der Dichte
α	Elektrische Leitfähigkeit in μS
α	Gemessener Drehwert in Grad
$[\alpha]$	Spezifische optische Drehung in Grad · dl/g · dm
σ	Oberflächenladungsdichte
2ϑ	Streuwinkel
ε	Dielektrizitätskonstante
ε_M	Molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge in nm oder Å
χ	Dicke der elektrischen Doppelschicht
Θ	Molare Elliptizität in Grad cm^2/Dezimol
η	Viskositätskoeffizient
ζ	Zetapotential
ψ	Oberflächenpotential

1 Einleitung

11 Allgemeines über Katalase

Katalase (Wasserstoffperoxid:Wasserstoffperoxid - Oxidoreduktase, EC 1. 11. 1. 6) ist ein in der Natur sehr weit verbreitetes Enzym, das in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen aufgefunden wurde. Es ist in aeroben Zellen, die ein Cytochromsystem besitzen, nachweisbar (1).

Die Entdeckung gelang O. Loew im Jahre 1901 (2). Wolff und de Stoecklin konnten 1910 erstmals eine hämoglobinfreie Erythrozytenkatalase isolieren (3), während erst 1937 Sumner und Dounce ein Verfahren zur Gewinnung reiner Rinderleberkatalase beschrieben (4). Diesen Autoren gelang im gleichen Jahr auch die erstmalige Kristallisation des Enzyms. Heute werden zur Gewinnung von Rinderleberkatalase vornehmlich drei Verfahren, nämlich das von Schnuchel (5), Shirakawa (6) und Sumner (4), angewendet.

Seit der Entdeckung, aber vor allem nach der Reindarstellung der einzelnen Katalasen, waren diese in den Labors der Grundlagenforschung von großem Interesse. K. G. Stern (7) gelang der qualitative Nachweis von Protohämin als prosthetischer Gruppe. Sumner und Dounce fanden in der von ihnen kristallisierten Rinderleberkatalase einen Eisengehalt von 0, 09 - 1 % und konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Greenfield und Price (8) den Nachweis erbringen, daß Rinderleberkatalase vier prosthetische Gruppen pro Molekül besitzt. Zusammen mit Gralén (9) bestimmte Sumner das Molekulargewicht mit Hilfe der Ultrazentrifuge zu 250. 000. Dieser Wert wurde seitdem von anderen Arbeitsgruppen mehrfach überprüft, wobei verschiedene Ergebnisse (von 225. 000 - 250. 000) zustande kamen. Bonnichsen, Chance und Theorell ermittelten das pH-Optimum bei pH 6, 8 - 7, 0 und das Temperaturoptimum bei 40 °C (10). Daß dieses Enzym eines der aktivsten ist, zeigt die von Sumner et al. (137) gefundene Wechselzahl von 5 - 7 Mio Mol Substrat/min pro Mol Enzym.

Die Lösungen von Rinderleberkatalse sind je nach Konzentration und Lösungsmittel grün bis braun gefärbt. Das Enzym ist in Wasser praktisch unlöslich, kann aber leicht durch schwach alkalische Tris- oder Phosphatpuffer oder mit wässrigen Ammoniaklösungen in Lösung gebracht werden. Besonders stabil sind Katalaselösungen in Glyzerin.

Katalase gehört neben Peroxidase zur Gruppe der Hydroperoxidasen. Die von beiden Enzymen katalysierte Reaktion gehorcht folgender vereinfachter Gleichung:

$$ROOH + H_2X \longrightarrow ROH + H_2O + X$$

Bei beiden Enzymen sind ein Wasserstoffperoxidmolekül (R = H) oder Alkylhydroperoxide mit kurzer Kettenlänge Wasserstoffakzeptoren, im Fall der Katalase dient ein zweites Wasserstoffperoxidmolekül ($X = O_2$) als Wasserstoffdonator, während bei der Peroxidase ein organisches Substrat diese Rolle übernimmt. Neben diesem "katalatischen" Reaktionstyp kann Katalase aber auch wie eine Peroxidase wirken, also verschiedene Substrate "peroxidatisch" oxidieren. So werden z. B. Methanol (11), Äthanol (12) Ameisensäure (12), Thiole (13) und Phenole (14) mit Wasserstoffperoxid unter Katalyse des Enzyms oxidiert. Die bei weitem bevorzugte Reaktion von Katalase ist jedoch die Zersetzung von Wasserstoffperoxid, die nahezu vollständig verläuft. Als einer der ersten beschäftigte sich Chance mit dem Wirkungsmechanismus des Enzyms, aber auch Theorell, Sumner, Keilin und Nicholls befaßten sich eingehend mit dieser Problematik (15 - 18), die heute weitgehend aufgeklärt ist. Anstelle einer Darlegung dieser Arbeiten und ihrer Ergebnisse sei hier auf die ausführlichen Monographien von Deisseroth und Dounce (19) bzw. Nicholls und Schonbaum (20) verwiesen.

Die physiologische Bedeutung von Katalase ist trotz intensiver Forschung nach wie vor umstritten. Manche Autoren schrieben dem Enzym eine Schutzwirkung zu, die auf seiner "katalatischen" Eigenschaft, also der Fähigkeit, Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zu spalten, beruht (1). Als gewichtige Begründung hierfür wurde die Tatsache ins Feld geführt, daß Katalase in Leber- und Nierenzellen in höchster Konzentration, bezogen auf das Proteingewicht, in den Peroxisomen enthalten ist (21). Diese Partikel enthalten auch Xanthinoxidase, Uricase und D-Aminosäureoxidase. Durch die Anwesenheit dieser Enzyme kann Wasserstoffperoxid entstehen, welches von Katalase zerstört wird. Es konnte jedoch nicht zwingend bewiesen werden, daß die Entfernung des Wasserstoffperoxids auf "katalatischem" Weg geschieht. Deshalb muß die Möglichkeit einer "peroxidatischen" Umsetzung ebenfalls in Betracht gezogen werden, was besonders von Chance (22) gefordert wurde.

Der Theorie der Schutzfunktion von Katalase steht die in Japan gemachte Entdeckung einiger Fälle von Akatalasemia bei Menschen gegenüber (23). Bei allen untersuchten Fällen konnte völliges, erbliches Fehlen von Katalase nachgewiesen werden. Das einzige medizinische Symptom bestand in einer erhöhten Anfälligkeit gegen dentale Infekte. Es wurde kein Hinweis auf einen Defekt oder eine Veränderung im Stoffwechsel gefunden. Diese Tatsache veranlaßte Nicholls (20), Katalase zumindest bei den höheren Tieren als "fossiles Enzym" zu bezeichnen.

Neben der Verwendung in der biochemischen Grundlagenforschung findet Katalase zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid und zur Zerstörung von Peroxiden in den verschiedensten Testzusammensetzungen, z. B. bei der Aktivitätsmessung der Glukose-Oxidase (24) und der Aminosäure-Oxidase (25) Anwendung. Darüber hinaus wird das Enzym dort eingesetzt, wo unter schonenden Bedingungen (Druck, Temperatur, pH) Wasserstoffperoxid entweder zur Erzeugung naszierenden Sauerstoffs (Oxidation grosser Moleküle in der organisch- präparativen Chemie) langsam zersetzt oder nach einer vollzogenen Reaktion schnell und restlos zerstört werden soll. So kann z. B. zur Sterilisation von Milch verwendetes Wasserstoffperoxid durch Zugabe von Katalase unschädlich gemacht werden.

12 Heterogenität von Katalase

Mit der Entwicklung und Verfeinerung der biochemischen Analysenverfahren konnten bereits in den 50er Jahren Hinweise auf eine heterogene Struktur von Katalase erlangt werden. So erhielten Price und Greenfield (26) 1954 aus Rattenleberkatalase durch Chromatographie an Calciumphosphatgel - Zellulose - Säulen vier Fraktionen unterschiedlich hoher spezifischer Aktivität. Nishimura et al. (27) trennten Rattenleberkatalase mittels Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Celit-Calciumphosphatgel) in zwei Komponenten auf. Sie konnten darüber hinaus mit Hilfe der Immunoelektrophorese zeigen, daß die beiden Komponenten nicht einheitlich waren, da sich im einen Fall 3, im anderen 6 Präzipitatlinien bildeten. Auch Erythrozytenkatalase von Ratten erwies sich als heterogen und ergab 6 Präzipitatlinien, welche in 3 Paaren angeordnet waren. Aus diesen Ergebnissen folgerten die Autoren, daß bei Erythrozyten- und Leberkatalase Isoenzyme existieren, und schlugen einen Aufbau des Katalasemoleküls aus

6 Untereinheiten vor. 1965 berichteten Holmes und Masters (28), Ratten-, Mäuse- und Schafleberkatalase durch Calciumphosphatgel-Zellulose-Chromatographie in 3, und durch Polyacrylamid-Elutionselektrophorese in 5 Fraktionen fast gleicher Aktivität aufgetrennt zu haben. In späteren Experimenten (29) separierten sie Homogenate von Mäuseleber durch Gradientenzentrifugation in "large granules", "small granules" und den Überstand, extrahierten jede dieser 3 Fraktionen mit verschiedenen wässrigen Lösungsmitteln (DTT und/oder EDTA und/oder Triton X-100 enthaltend) und unterwarfen die katalasehaltigen Extrakte einer Stärkegelelektrophorese. Dabei zeigten sich insgesamt 5 elektrophoretisch unterschiedliche, katalaseaktive Banden, die die Autoren auf die Existenz von Isoenzymen zurückführten.

Thorup und Mitarbeiter (30) trennten menschliche Erythrozytenkatalase durch Chromatographie an DEAE-Zellulose in 3 Fraktionen (A, B, C) auf, welche in ihrer anodischen elektrophoretischen Beweglichkeit und in der Molarität des zur Elution benötigten Puffers differierten ($A < B < C$). Sie konnten darüber hinaus feststellen, daß die Fraktionen A und B instabil waren, und die Tendenz zeigten, sich in Fraktion C zu verwandeln. Solche molekularen Änderungen waren nicht auf der Basis von Isoenzymen zu erklären, sie stellten im Gegenteil ein gewichtiges Gegenargument dar.

Die Arbeitsgruppe um Aebi, welche gleichfalls dieses Problem bearbeitete (31, 32) zeigte an Erythrozytenkatalase von Mensch und Pferd, daß bei Isolierung des Enzyms aus roten Blutkörperchen in Abwesenheit von Sauerstoff (stickstoffgesättigte, EDTA-haltige Puffer) nur Fraktion A erhältlich war, daß aber unter oxidativen Isolierungsbedingungen (alle Puffer waren sauerstoffgesättigt) allein Fraktion C isoliert werden konnte. Eine mehrtägige Dialyse gegen sauerstoffgesättigten Phosphatpuffer führte Fraktion A in Fraktion C über, welche sich andererseits unter Einwirkung von β-Mercaptoäthanol in Fraktion A verwandeln ließ.

Ähnliche Ergebnisse berichtete Heidrich (33) von seinen Untersuchungen an Rinderleberkatalase. Chromatographie des Enzyms an DEAE-Sephadex ergab 2 nicht ganz voneinander getrennte Gipfel. Die elektrophoretische (Polyacrylamidgel, pH 8, 5) Analyse der einzelnen katalasehaltigen Fraktionen des Eluates zeigte bis zu 5 Banden. Die anodisch am langsamsten (schnellsten) wandernde Komponente war durch die niederste (höchste) Salzkonzentration vom Austauscher eluiert worden. (Im folgenden wird die

Katalasespezies mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität als Kat1 bezeichnet. Die anderen Spezies werden entsprechend ihrer zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit Kat2, Kat3, Kat4 und Kat5 genannt.)

Kat1 und Kat5 besaßen sehr ähnliche spezifische Aktivität, nämlich eine "Katalasefähigkeit" von 32.000 (Kat1) bzw. 29.000 (Kat5).

Einwirkung des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) auf Kat5 führte zur Bildung von Kat1, durch Dialyse gegen sauerstoffgesättigten Trispuffer (pH 7, 8) entstand aus Kat1 wieder Kat5.

Die Frage, in welcher Form Rinderleberkatalase in vivo vorkommt, konnte Heidrich (34) dadurch klären, daß er hochgereinigte Peroxisomen auf Acrylamidgele aufbrachte, diese dort durch Zugabe von Triton X-100 schonendst öffnete und die freiwerdende Katalase sofort durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisierte. Nach der Aktivitätsfärbung war nur eine der fünf bekannten Banden, nämlich die mit der geringsten Mobilität, zu beobachten. Wurde die Katalase vor der Elektrophorese aus den Peroxisomen durch Ultrabeschallung oder durch halbstündige Zentrifugation bei 150.000 g freigesetzt, so zeigten sich fünf katalaseaktive Banden. Aus diesen Befunden konnte Heidrich schließen, daß Rinderleberkatalase in vivo nur in Form von Kat1 existiert und daß die anderen Spezies (Kat2, Kat3, Kat4, Kat5) erst nach dem Verlassen der Peroxisomen bzw. durch die Bedingungen, die zu ihrer Freisetzung führten, entstanden.

13 Problemstellung

Obwohl in den letzten Jahrzehnten eine Fülle experimenteller Untersuchungen an verschiedenen Katalasen vorgenommen wurde, blieben doch einige, zum Teil grundsätzliche Fragen offen. So wurde das Problem der Heterogenität von verschiedenen Arbeitskreisen eingehend bearbeitet, ohne daß jedoch mit letzter Sicherheit entschieden werden konnte, ob es sich dabei um das Auftreten von Isoenzymen oder von Konformeren handelt. Diese Fragestellung sollte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Rinderleberkatalase durch Anwendung biochemischer und biophysikalischer Chrakterisierungsmethoden von möglichst vielen Seiten beleuchtet werden.

Zur Lösung des Problems schien die vergleichende Untersuchung von Kat1 und Kat5 am erfolgversprechendsten, weil zwischen diesen beiden Spezies die größten Unterschiede zu erwarten waren. Da die Umwandlung der einzelnen Katalasespezies ineinander nicht nur durch Einwirkung chemischer Agentien (z. B. Dithiothreitol), sondern auch durch bloße Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 (also ohne Einwirkung von Chemikalien) möglich war (s. 5111), wurden Kat1 und Kat5 auf diesem Weg dargestellt, isoliert und schließlich auf ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften hin untersucht.

Eine weitere Informationslücke bestand in den Kenntnissen über Zahl und Molekulargewicht der Untereinheiten des Enzyms. Darüber lagen sehr widersprüchliche Angaben vor, welche sich von Molekulargewichten von 14.000 (129) bis 88.000 (132) und von einer Anzahl an Untereinheiten zwischen 3 (127) und 18 (129) erstreckten.

Außerdem sollten die Untereinheiten auf Gleich- bzw. Verschiedenheit ihres Aufbaues und auf Anwesenheit nichtproteinartiger Verbindungen (abgesehen von der prosthetischen Gruppe) geprüft werden.

2 Material

21 Rinderleberkatalase

Rinderleberkatalase wurde von den Firmen Boehringer & Söhne, Mannheim, Cal Biochem, Los Angeles, Kalifornien, USA und Worthington, Bioch. Corp., Freehold, N. J., USA in Form wässriger Kristallsuspensionen bezogen. Es kamen in dieser Arbeit nur Rinderleberkatalasepräparationen vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad zur Anwendung.

22 Chemikalien

Anorganische und organische Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Natriumdodecylsulfat (SDS), hochgereinigtes Guanidinhydrochlorid ($E_{1\ cm}$ = < 0, 01 bei 260 nm in 6 M Lösung), 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) p. A., 5, 5′- Dithiobis- (2-nitrobenzoesäure) (DTNB) p. A., β-Mercaptoäthanol p. A., N, N, N′, N′-Tetramethyläthylendiamin (TMED), N, N′- Methylenbisacrylamid (Bis), und Acrylamid stammten von der Firma Serva, Heidelberg.

Sämtliche verwendeten Enzyme waren Produkte von Boehringer & Söhne, Mannheim.

Blue Dextran 2000 stammte von der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden, Dithiothreitol (DTT) von Cal Biochem, Los Angeles, USA.

3 Biochemische Präparations- und Analysenmethoden

31 Darstellung von Rinderleberkatalasen

311 Isolierung von Katalase aus Rinderleber

Für ORD- und CD-Messungen war es notwendig, Katalase aus Rinderleber selbst zu isolieren, weil die käuflichen Präparate Werte lieferten, die mit den in der Literatur angegebenen (s. 523) nicht übereinstimmten. Da diese Werte mit einer nach Shirakawa (6) isolierten Rinder-

leberkatalase erzielt wurden, gelangte das gleiche Verfahren auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung. Der Reinigungsgang von Shirakawa wurde bis auf eine Ausnahme vollkommen eingehalten. Diese bestand darin, daß sämtliche Puffer 0, 05 % Thymol als Konservierungsmittel enthielten. Die eingesetzten 1, 5 kg schlachtfrische Rinderleber lieferten etwa 2, 3 g Katalase-Rohkristalle. Nach viermaligem Umkristallisieren betrug die Ausbeute ca. 1, 0 g reine Rinderleberkatalase mit einer "Katalase-Fähigkeit" von 31. 000 (35). Die zur Reinheitsprüfung herangezogene Discelektrophorese zeigte nur katalasespezifische Banden und kein Fremdprotein.

312 Darstellung von Kat1 und Kat5

Die Reindarstellung von Kat1 und Kat5 geschah durch Ionenaustauschchromatographie nach Heidrich (33). Dazu wurde eine auf 18°C thermostatisierte Glassäule (210 cm x 1 cm) mit DEAE-Sephadex A 50 Medium (Charge Nr. To 3303) gefüllt. Dieses Trennmaterial wurde vor der Säulenfüllung 24 Stunden im Startpuffer suspendiert, zehnmal "de-fined" und gründlich mittels einer Wasserstrahlpumpe entlüftet. Vor jeder Trennung wurde die Säule mit 500 ml Startpuffer äquilibriert und dann 50 - 100 mg Katalase auf das obere Ende der Säule aufgetragen. Zur Elution kam ein linearer Gradient, der 0, 01 % Thymol enthielt, zur Anwendung. Das erste Gefäß des Gradientenmischers enthielt 275 ml Startpuffer, bestehend aus 0, 05 M Tris, 0, 1 M NaCl pH 7, 9 (HCl). Im zweiten Gefäß befanden sich 275 ml des folgenden Puffers: 0, 05 M Tris, 0, 3 M NaCl pH 7, 9 (HCl). Eine rückstoßfreie Pumpe beförderte den Puffer durch die Säule und mit Hilfe eines Fraktionsteilers wurden 2 ml pro Stunde fraktioniert. Die Katalasekonzentration konnte spektroskopisch mit einer Durchlaufküvette bei 405 nm verfolgt werden.

Jede Fraktion, die Katalase enthielt, wurde discelektrophoretisch geprüft (s. 5111). Auf diese Weise war es möglich, reine Kat1 und Kat5 zu identifizieren und zu isolieren.

32 Elektrophoretische Methoden

321 Discelektrophoresen

3211 Discelektrophorese von Katalase im nativen Zustand

Die Discelektrophoresen wurden in einer selbstgebauten, kühlbaren Apparatur durchgeführt. Der Elektrodenpuffer (pH 8, 4) bestand aus einer wässrigen 1 : 8-Verdünnung eines Puffers, welcher 109 g Tris und 36 g Borsäure pro Liter enthielt. Die Gele wurden aus folgenden Stammlösungen bereitet:

Lösung a: 10, 9 g Tris, 3, 6 g Borsäure, 0, 46 ml N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin (TMED) ad 100 ml

Lösung b: 30 g Acrylamid, 0, 8 g N, N'-Methylenbisacrylamid (Bis) ad 100 ml

Lösung c: 0, 1 g Ammoniumperoxodisulfat ad 100 ml

Lösung d: 25, 6 ml 1 M H_3PO_4, 5, 7 g Tris ad 100 ml

Lösung e: 10 g Acrylamid, 2, 5 g Bis ad 100 ml

Lösung f: 4 mg Riboflavin ad 100 ml

Für die Herstellung des Trenngels wurden 5 ml Lösung a, 10 ml Lösung b und 20 ml Wasser vermischt, an der Wasserstrahlpumpe entgast und anschließend mit 5 ml der Lösung c versetzt. Mit dieser Lösung wurden dann Glasröhrchen (Durchmesser 6 mm) bis zu einer Höhe von 6 cm gefüllt und vorsichtig mit Wasser überschichtet (zur Bildung einer ebenen Oberfläche). Nach ca. 20 min war die Polymerisation beendet, so daß das Sammelgel aufgebracht werden konnte. Dies bestand aus einer Mischung folgender Lösungen: 2 ml Lösung d, 4 ml Lösung e, 2 ml Lösung f und 8 ml Wasser. Nach Absaugen des überstehenden Wassers wurden auf die Trenngele jeweils 0, 2 ml (= ca. 6 mm) der Sammelgel-Lösung aufgebracht, wieder mit Wasser überschichtet und zur Polymerisation etwa eine halbe Stunde unter eine UV-Lampe gestellt. Dann konnten die Röhrchen in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und auf 3 °C gekühlt werden. Wenn diese Temperatur erreicht war, wurden die mit Saccharose versetzten Proteinlösungen durch

Unterschichten des Elektrodenpuffers auf das Sammelgel aufgebracht. Unter einer Spannung von ca. 70 V (bei einer Stromstärke von 1 mA pro Gel) wurde das Protein im Sammelgel konzentriert. Nach dem Eintreten in das Trenngel und der Erhöhung der Stromstärke auf 2 mA pro Röhrchen betrug die Spannung etwa 200 V. Sie stieg im Verlauf der dreistündigen Elektrophorese auf 350 V bis 380 V an.

Die Fixierung und Färbung der Proteinbanden geschah über Nacht mit einer Coomassie-Trichloressigsäurelösung (200 ml 20 %ige Trichloressigsäure + + 4 ml einer Lösung, bestehend aus 0,25 g Coomassie Brilliant Blue, 91 ml 50 % Methanol, 9 ml Eisessig). Diese Methode der Färbung erwies sich als vorzüglich geeignet, da sie einfach, hoch auflösend und schnell zum Ergebnis führte (bereits nach einer Stunde waren die ersten Proteinbanden sichtbar). Ein weiterer Vorteil bestand darin, daß eine Entfärbung nicht notwendig war, da aufgrund der niedrigen Farbstoffkonzentration praktisch nur die Proteinbanden gefärbt wurden. Das Acrylamidgel blieb nahezu vollständig farblos, so daß auch schwache Proteinbanden einwandfrei identifizierbar waren.

3212 Discelektrophorese in Anwesenheit von 8 M Harnstoff

Zur Bereitung der Gele kamen die gleichen Stammlösungen zur Anwendung wie bei 3211 beschrieben. Um jedoch Trenn- und Sammelgel 8 M an Harnstoff zu machen, wurde wie folgt verfahren: 5 ml Lösung a, 10 ml Lösung b und 19,2 g Harnstoff wurden unter Lösung des Harnstoffs in einem 50 ml-Meßzylinder mit Wasser auf 39 ml aufgefüllt. Nach Entgasen der Lösung wurde die Polymerisation mit 1 ml Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (0,1 g ad 10 ml) eingeleitet, sofort die Trenngele (Länge 7 cm) gegossen und mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation vollzog sich gewöhnlich innerhalb einer halben Stunde.

Das Sammelgel bestand aus 2 ml Lösung d, 4 ml Lösung e, 2 ml Lösung f, 7,7 g Harnstoff und soviel Wasser, daß die gesamte Lösung ein Volumen von 16 ml erreichte. Je 0,2 ml davon wurden auf das Trenngel aufgebracht, mit Wasser überschichtet, und unter UV-Licht photopolymerisiert.

Als Elektrodenpuffer gelangte der gleiche zur Anwendung wie bei 3211, jedoch mit 0,1 % β-Mercaptoäthanol. Der Probenpuffer, in dem die Proteine

gelöst waren, bestand aus 8 M Harnstoff, 13, 6 g Tris, 4, 5 g Borsäure, 10 g β-Mercaptoäthanol pro Liter, wobei hier wie beim Elektrodenpuffer das β-Mercaptoäthanol erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt wurde.

Um die Möglichkeit einer Reaktion zwischen dem Protein und Resten von Ammoniumperoxodisulfat (Bildung von Oxidationsprodukten) auszuschliessen, wurde letzteres vor dem Aufbringen des Sammelgels aus dem Trenngel elektrophoretisch entfernt (Stromstärke 3 mA/Gel, Dauer eine halbe Stunde). Als zweiter Sicherheitsfaktor in dieser Richtung diente das dem Proben- und Elektrodenpuffer beigefügte β-Mercaptoäthanol.

Die Elektrophoresen wurden bei 1, 5 mA pro Gel und 220 V begonnen. Die Temperatur betrug 10 °C. Nachdem das Protein in das Trenngel eingelaufen war, wurde die Stromstärke auf 3 mA pro Gel erhöht. Das Ende des Laufes war nach 3, 5 bis 4 Stunden erreicht. Die Spannung hatte dann einen Wert von ca. 720 V. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Amidoschwarz (1 % (w/v) Amidoschwarz, 7 % Essigsäure) angefärbt. Die Entfärbung der Gele geschah mit 10 %iger Essigsäure.

3213 SDS-Discelektrophoresen

Shapiro, Vinuela und Maizel (36) zeigten 1967, daß die Molekulargewichte von Polypeptiden aus den relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten ihrer SDS-Komplexe in Polya crylamidgelen bestimmt werden können. Diese Möglichkeit wurde daraufhin von zahlreichen Autoren aufgegriffen und neue, verbesserte Trennsysteme wurden entwickelt.

Zwei dieser Systeme, nämlich nach Weber und Osborn (37) bzw. nach Laemmli (38) kamen in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

Beim Weber-Osborn-System wurden 7, 5 %ige Gele mit einer Länge von 8 cm verwendet. Lösung und Vorbereitung der Proteine vollzog sich bei 37, 5 °C in einem Puffer, welcher 0, 1 % SDS und 0, 01 M Na-Phosphat (pH 7, 0), also kein β-Mercaptoäthanol, enthielt. In bestimmten Fällen wurde außerdem noch Harnstoff (8 molar) zugefügt. Auch der Elektrodenpuffer war frei von β-Mercaptoäthanol. Bei einer Temperatur von 15 °C und einer Stromstärke von 8 mA pro Gel betrug die Laufzeit 7 Stunden. Färbung und Entfärbung geschahen wie bei Weber-Osborn beschrieben.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Katalaseuntereinheiten kam das Elektrophoresesystem nach Laemmli zur Anwendung. Dieses bot gegenüber dem Na-Phosphat-gepufferten System von Weber und Osborn einige Vorteile, da Tris als Kation verwendet wurde: Erstens konnte bei wesentlich niedrigerer Temperatur (2 bis 3°C) gearbeitet werden, da in Anwesenheit von Tris das SDS selbst bei dieser Temperatur noch nicht ausfiel. Dies bewirkte herabgesetzte Diffusion, also schärfere Banden. Zweitens wurde unter Verwendung eines Sammelgels gearbeitet, was eine weitere Bandenschärfung gewährleistete. Der dritte Vorteil bestand in der geringen elektrophoretischen Beweglichkeit des großen Trisions gegenüber dem wesentlich kleineren Natriumion. Die Folge davon war eine geringere Stromstärke und damit wenig Joulesche Wärme.

Vor der Durchführung der Elektrophoresen wurden die Proteine zwei Stunden bei 37,5°C inkubiert. Dabei waren sie in folgendem Puffer gelöst: 8 M Harnstoff, 2 % SDS, 1 % β-Mercaptoäthanol, 0,05 M Tris pH 6,8 mit HCl (β-Mercaptoäthanol wurde erst unmittelbar vor Gebrauch zugefügt). Die Elektrophoresen wurden mit 10 %igen Trenngelen bei einer Temperatur von 3°C, einer Stromstärke von 3 mA pro Gel und einer Spannung von 280 V über einen Zeitraum von 4 Stunden ausgeführt. Die Länge der Trenngele betrug 10 cm, die der Sammelgele 0,6 cm.

Die viertelstündige Färbung erfolgte nach Weber und Osborn, die Entfärbung ging über Nacht mittels 8 %iger Essigsäure vor sich.

322 Isoelektrische Fokussierung

Mit der Elektrofokussierung stand ein Verfahren zur Verfügung, das eine Auftrennung von verschiedenen Proteinen aufgrund ihres isoelektrischen Punktes (IP) erlaubte und gleichzeitig die genaue Bestimmung der isoelektrischen Punkte ermöglichte. Anstelle weiterer Ausführungen über Theorie und Praxis dieser Methode sei hier auf die ausführliche Literatur verwiesen (39, 40, 41).

Die Versuche wurden nach der Bedienungsanleitung der Fa. LKB-Produkter AB durchgeführt. Es kam eine 110 ml fassende Säule (LKB 8101) zur Anwendung.

Die Ampholinekonzentration betrug 1 %, die Temperatur 4°C, ein Saccharosegradient stabilisierte die Säulenfüllung (Diffusion, Konvektion), an deren oberem Ende sich die saure Elektrodenlösung (H_2SO_4) befand, während am unteren Ende Äthanolamin als basische Elektrodenlösung diente. Der für die Trennung geeignetste pH-Bereich von 4 - 7 mußte durch Mischen gleicher Teile von Ampholine des Bereiches pH 4 - 6 und pH 5 - 7 erstellt werden, da er käuflich nicht erhältlich war.

Die in Wasser gelösten Proben von Kat1 und Kat5 wurden den Fraktionen 6 und 7 beigemengt. Am Ende der Elektrofokussierung (65 Stunden bei 400 V) wurde die Säule in Fraktionen zu 1,5 ml unter Stickstoffatmosphäre entleert und von jeder Fraktion der pH-Wert und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Durch Auftragung der pH-Werte gegen die gemessenen Extinktionen ergaben sich die isoelektrischen Punkte.

Zur Identifizierung der separierten Proteine und zu deren Prüfung auf etwaige Veränderung wurden diese schließlich noch discelektrophoretisch (3211) untersucht.

323 Trägerfreie Elektrophorese

3231 Qualitative Betrachtungen

32311 Die elektrische Aufladung von Oberflächen

Die meisten Substanzen erhalten eine elektrische Aufladung ihrer Oberfläche, wenn sie in Kontakt mit einem polaren Medium (z. B. Wasser) gebracht werden, und zwar kann dies durch Ionisation, Ionen-Adsorption und Ionenauflösung geschehen.

Aminosäuren und Proteine erhalten ihre Ladung hauptsächlich durch Ionisation von dissoziierbaren Gruppen. Die Ionisation dieser Gruppen hängt dabei in erster Linie vom pH-Wert der Lösung ab.

Der zweite wichtige Faktor bei der Aufladung der Oberfläche von Aminosäuren und Proteinen ist die Ionenadsorption. Sie ist auf die anteilmäßig ungleiche Anlagerung von gegensätzlich geladenen Ionen zurückzuführen. Oberflächen, die in Kontakt mit einem wässrigen Medium sind, erhalten dabei öfter eine negative als eine positive Ladung. Der Grund dafür ist in der Tatsache zu suchen, daß Kationen im allgemeinen stärker hydratisiert sind als Anionen. Deshalb neigen Kationen mehr dazu, sich im umgebenden wässrigen Medium aufzuhalten, als die kleineren, weniger hydratisierten und stärker polarisierenden Anionen, die eine größere Tendenz zeigen, spezifisch adsorbiert zu werden.

Oberflächen, die bereits durch z. B. Ionisation geladen sind, zeigen gewöhnlich eine ausgeprägte Neigung, Gegenionen zu adsorbieren; dies kann sogar zu einer Ladungsumkehrung führen. Auch Partikel mit neutraler Oberfläche, also ohne Eigenladung, erhalten durch Adsorption eine meist negative Oberflächenladung. Beide Phänomene sind in ihrer quantitativen Auswirkung im Vergleich zu den obenerwähnten Effekten meist jedoch gering.

32312 Die elektrische Doppelschicht

Proteine umgeben sich, wenn sie z. B. in einer wässrigen Pufferlösung gelöst werden, mit einer elektrischen Doppelschicht. Diese besteht aus zwei verhältnismäßig scharf gegeneinander abgegrenzten Regionen: einer kompakten inneren, die adsorbierte Ionen enthält, und in der Größenordnung von 5 Å liegt. Diese Schicht wird Stern- oder Helmholz-Schicht genannt. Die äußere, sogenannte Gouy-Chapman-Schicht oder Debye-Hückelsche-Ionenwolke, ist diffus und besteht aus Ionen, die entsprechend dem Einfluß von elektrischen Kräften und der ungeordneten thermischen Bewegung einer Boltzmann-Verteilung unterliegen. Beide Schichten werden durch die sogenannte Scherschicht (Scherfläche) voneinander getrennt. Diese stellt ein Gebiet rapide wechselnder Viskosität dar. Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, nimmt das Oberflächenpotential ψ_0 auf ψ_δ in der Sternschicht ab und wird durch die Scherschicht auf das ζ- (zeta) Potential reduziert, um beim Durchlaufen der Gouy-Chapman-Schicht schließlich

den Wert 0 zu erreichen.

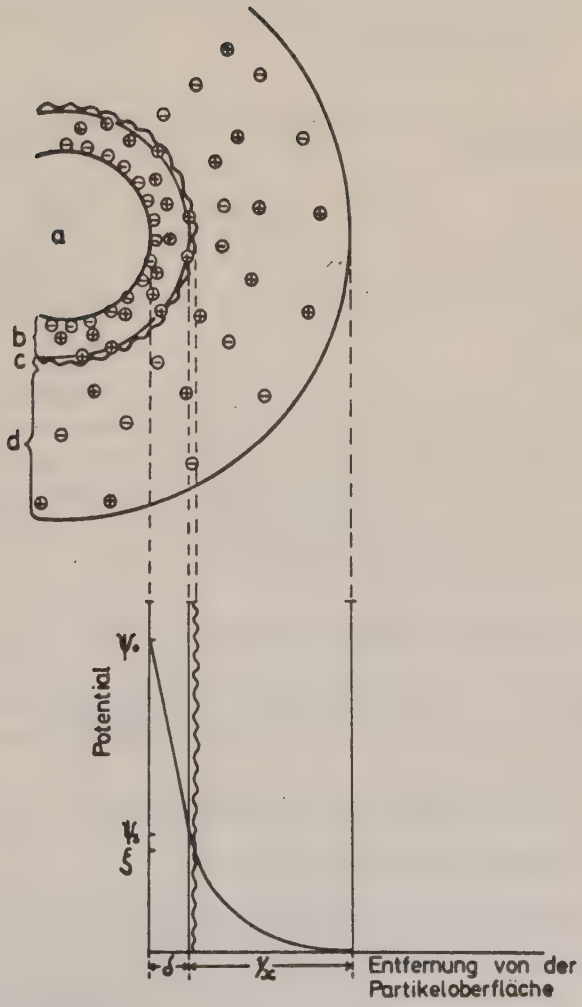


Abb. 1
Schematische Darstellung eines mit einer elektr. Doppelschicht umgebenen Partikels und der dabei auftretenden Potentiale.
a=Partikel
b=Sternschicht
c=Scherschicht
d=Gouy-Chapman-Schicht.

3232 Quantitative Betrachtungen

Die Elektrophorese ist definiert als Transportvorgang geladener Stoffteilchen in einem elektrischen Feld in Gegenwart von Elektrolytionen. Auf die geladenen Stoffteilchen wirkt eine elektrische Kraft e x H (e = Ladung, H = = Feldstärke) und eine Reibungskraft $6 \cdot \pi \cdot a \cdot \eta$ (a = Radius des Partikels; η = Viskositätskoeffizient).

Nach Debye-Hückel gilt dann für die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit v:

$$v = \frac{e \times H}{6 \pi a \eta} \qquad (1)$$

Diese Gleichung gilt jedoch nur für kleine Ionen und bei unendlicher Verdünnung.

Smoluchowski stellt aufgrund der Überlegung, daß elektrokinetische Erscheinungen nur vom beweglichen Teil der Doppelschicht abgeleitet werden können, also auch die elektrophoretischen Beweglichkeitsdaten nur die Ermittlung des ζ -Potentials zulassen, folgende Gleichung auf:

$$v = \frac{\varepsilon \zeta H}{4 \pi \eta} \qquad (2)$$

Dabei ist ε die Dielektrizitätskonstante.

Gleichung (2) wurde aus elektroosmotischen Messungen in Kapillaren ermittelt. Sie gilt auch für Partikel unter folgenden Voraussetzungen:

1. neutrale, nicht geladene Teilchen;

2. verhältnismäßig große Teilchen;

3. keine Änderung der Viskosität, Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit in der elektrischen Doppelschicht;

4. kein Einfluß des elektrischen Feldes auf die Doppelschicht: Relaxationseffekt (Kometenform). Darunter versteht man eine unter dem Einfluß des elektrischen Feldes unsymetrische Ionenverteilung in der Gouy-

Chapman-Schicht. Die Ionen in dieser Schicht bewegen sich dabei in einer Richtung, die der Bewegungsrichtung des Partikels entgegengesetzt ist. Die Folge davon sind lokale Flüssigkeitsbewegungen entgegen der elektrophoretischen Teilchenwanderung, die Gouy-Chapman-Schicht wird, wie in Abb. 2 zu sehen ist, deformiert. Der Effekt wächst mit der Feldstärke, der Größe der Partikel und vor allem bei schnellen, polyvalenten Gegenionen.

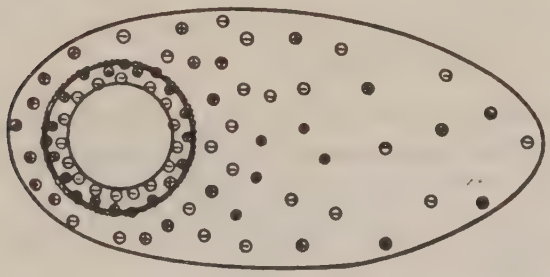


Abb. 2 Schematische Darstellung der durch den Relaxationseffekt verzerrten Gouy-Chapman-Schicht.

Die Smoluchowski-Gleichung läßt sich über das Coulombsche Gesetz umformen und lautet dann:

$$v = \frac{e \times H}{4 \pi \eta a} \qquad (3)$$

Gleichung (1) und (3) unterscheiden sich also nur um den Faktor 1/6 bzw. 1/4.

Maßgeblich für die Gültigkeit der einzelnen Gleichungen ist das Verhältnis:

$$\frac{\text{Teilchenradius + Sternschicht}}{\text{Ausdehnung der Ionenwolke}} = \frac{a}{1/\chi} \qquad (4)$$

Ist $a \cdot \chi > 300$, so gilt Gleichung (1), ist es $< 0,1$, so gilt Gleichung (3). Dazwischenliegende Werte sind zunächst nicht zu erfassen. Hier ist auch der Einfluß der Partikelgröße bei ansonsten gleicher Ladungsdichte besonders maßgebend.

Ersetzt man in Gleichung (1) oder (3) die Ladung durch die Ladungsdichte, so erhält man:

$$v = \frac{\delta \; a \; H}{\eta} \qquad (5)$$

Dabei ist δ die Oberflächenladungsdichte.

Henry versuchte die Debye-Hückel-Gleichung auch auf geladene Partikel zu erweitern und gleichzeitig den Relaxationseffekt zu erfassen. Zu diesem Zweck führte er ein Korrekturglied ein. Danach ergibt sich:

$$v = \frac{e \; x \; H}{6 \; \pi \; \eta \; a} \left[1 + d \cdot F(\chi \cdot a) \right] \qquad (6)$$

Für nicht leitende Partikel vereinfacht sich diese Gleichung zu:

$$v = \frac{e \; x \; H}{6 \; \pi \; \eta \; a} \; f(\chi \cdot a) \qquad (7)$$

Bei den Ausdrücken (1) bis (7) wurde bisher davon ausgegangen, daß die auf die Partikel ausgeübte Kraft gleich e x H sei. Dies gilt in Wirklichkeit nur für ladungsneutrale Umgebung. Da aber in der Gouy-Chapman-Schicht Gegenionen zur Ladung des Partikels überwiegen, wird diese Kraft vermindert. Die tatsächliche Ladung erzeugt nur die Kraft:

$$K = \frac{\varphi}{1 + \chi \cdot a} \cdot H \qquad (8)$$

wobei φ die Nettoladung ist. Daraus folgt, daß e in (1) bis (7) durch den Ausdruck $\varphi / 1 + \chi \cdot a$ zu ersetzen ist.

Die Kombination mit der Henry-Gleichung (7) ergibt für die Teilchennettoladung :

$$\varphi = \frac{6 \; \pi \; \eta \; a \; v \; (1 + \chi \cdot a)}{f(\chi \cdot a) \cdot H} \qquad (9)$$

Wenn der Radius der Pufferionen in einer Größenordnung ist, die dem Radius des in diesem Puffer gelösten Teilchens vergleichbar ist, so muß dies in der Henry-Gleichung berücksichtigt werden. Gorin änderte die Henry-Gleichung zur Berücksichtigung des Partikelradius a_i der Elektrolytionen ab und kam zu folgendem Ausdruck:

$$\varphi = \frac{6\pi\eta a\, v(1+\chi a+\chi a_i)}{H \cdot f(\chi a)(1+\chi a_i)} \qquad (10)$$

Da die elektrophoretische Beweglichkeit u_e folgender Gleichung gehorcht:

$$u_e = \frac{v}{H} \qquad (11)$$

ergibt sich für Gleichung (10):

$$\varphi = \frac{6\pi\eta a\, u_e(1+\chi a+\chi a_i)}{f(\chi a)\,(1+\chi a_i)} \qquad (12)$$

Die nach diesem Ausdruck berechnete Teilchenladung gibt allerdings nur die durch die Gegenionen der Sternschicht verminderte Teilchennettoladung an. Zur Ermittlung der bei einem bestimmten pH-Wert vorliegenden tatsächlichen Teilchennettoladung bietet sich folgender Weg an: Messungen der Beweglichkeit des Proteins werden in einer Konzentrationsreihe des Puffers, in dem das Protein gelöst ist, durchgeführt. Aus den Meßwerten lassen sich nach Gleichung (12) die Partikelladungen (ausgedrückt in z. B. Elementarladungen) entsprechend den Konzentrationen der die Partikel umgebenden Pufferionen berechnen. Durch Extrapolation auf unendliche Pufferverdünnung erhält man dann die dem vorliegenden pH-Wert entsprechende echte Teilchennettoladung.

3233 Zusammenstellung aller für die Ermittlung der Teilchennettoladung notwendigen Größen

Geometriefaktor G der Trennkammer:

$$G = \frac{\alpha \cdot U}{I \cdot b} \quad \frac{\mu S \cdot cm^{-1} \cdot V}{mA \cdot cm} \qquad (13)$$

Dabei ist α die elektrische Leitfähigkeit des Kammerpuffers, U die gemessene Spannung, I die Stromstärke und b die Kammerbreite.

Feldstärke H:

$$H = \frac{I \cdot G}{\alpha} \quad \left[\frac{V}{cm}\right] \tag{14}$$

In elektrostatischen Einheiten ausgedrückt:

$$H = 1,22 \frac{I}{\alpha} \left[\frac{ESU}{cm}\right] \tag{15}$$

wobei I in mA und α in $\mu S\ cm^{-1}$ eingesetzt werden.

Die Ionenstärke I berechnet sich für einfache, symmetrische Elektrolyten nach:

$$I = \sum c_e \cdot z_e^2 \tag{16}$$

Dabei steht c für die Molkonzentrationen aller Ionenarten und z für die Wertigkeit.

Die Dicke der elektrischen Doppelschicht χ beträgt nach Shaw (130):

$$\chi = 0,328\sqrt{\frac{298}{273 + T}} \cdot 10^8 \cdot \sqrt{I} \quad \left[cm^{-1}\right] \tag{17}$$

Radius a des Proteinmoleküls:

$$a = \sqrt{\frac{5}{3}} \cdot R_s \quad \left[\text{Å}\right] \tag{18}$$

R_s ist der Streumassenradius des Moleküls.

Radius a_1 des Elektrolyten:

$$a_1 = \sqrt[3]{\frac{3\,M}{4\pi N} \cdot \bar{V}} \qquad (19)$$

Darin sind:

M = Molekulargewicht
$\bar{V}$ = Kehrwert der Dichte
N = Loschmidtsche Zahl.

Verweilzeit t_o des Proteins in der Kammer:

$$t_o = 3600 \frac{V_o}{V_p} \left[\text{sec}\right] \qquad (20)$$

wobei V_o das Füllvolumen der Trennkammer und V_p das pro Stunde durch die Kammer gepumpte Puffervolumen ist.

Elektrophoretische Beweglichkeit u_e:

$$u_e = \frac{s}{H\,t_o} = \frac{v}{H} \left[\frac{cm^2}{ESU \cdot sec}\right] \qquad (21)$$

s ist die Strecke, um die das Molekül abgelenkt wurde, v die Wanderungsgeschwindigkeit des Partikels.

Die Elementarladung $e = 4,803 \cdot 10^{-10} \left[\text{ESU}\right]$ (22)

f ($\chi \cdot a$) wurde einer graphischen Darstellung von Wiersema (42) entnommen.

3234 Die Elektrophoreseapparatur

Zur Durchführung der Versuche wurde die VAP 2 nach Hannig (43) verwendet.

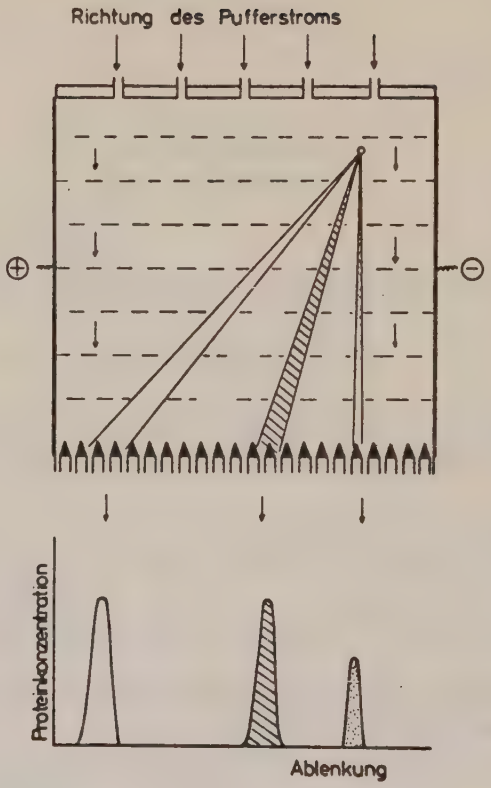


Abb. 3 Schematische Darstellung der Trennkammer (oben); Darunter Elutionsdiagramm der abgelenkten Proteine (die gestrichelte Fläche stellt Kat1, die leere Fläche Kat5, der mit Punkten ausgefüllte Gipfel den unabgelenkten Farbstoff dar.

324 Chemische Charakterisierungsmethoden

3241 Stickstoffbestimmung

Um die von Kat1 und Kat5 gemessenen Absorptionsspektren (s. 521) auf gleiche Konzentration berechnen zu können, war eine von spektroskopi-

schen Grundlagen unabhängige Methode nötig. Als solche bot sich die Bestimmung des Stickstoffgehaltes an. Dabei erwies sich unter den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten (Lowry (44), Biuret nach Weichselbaum (45, 46)) eine von Strauch (47) modifizierte Kjeldahlmethode als am vorteilhaftesten. Sie bot neben einfacher Durchführung und geringem Zeitaufwand eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit und Genauigkeit und übertraf mit diesen Eigenschaften die obenerwähnten Verfahren eindeutig.

Die Proteinlösungen wurden vor der Bestimmung ihres Stickstoffgehaltes unter sechsmaligem Pufferwechsel in einen stickstofffreien Puffer (0, 01 M Phosphat, 0, 2 M NaCl pH 8, 0) überführt und anschließend bei 48200 g 20 min zur Entfernung von Verunreinigungen zentrifugiert.

Von Kat1 und Kat5 wurden je 60 Proben auf ihren Stickstoffgehalt analysiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst der organisch gebundene Stickstoff mit einem Selen-Schwefelsäurereagens bei 320°C in Ammonium überführt. Dieses bildete bei Zugabe von Nesslerreagens einen gelben Farbstoff. Die Intensität des Farbstoffes konnte bei 420 nm gemessen werden. Eine mit einer Stickstoffstandardlösung (Ammoniumsulfat, gelöst in 0, 2 N Schwefelsäure,) aufgestellte Eichkurve ermöglichte dann die Bestimmung des Stickstoffgehaltes. Die gefundenen Werte streuten nur um ± 3 %, so daß den gebildeten Mittelwerten große Genauigkeit zukommt.

Selbstverständlich ist es trotz einer noch so genauen Stickstoffbestimmung nicht möglich, daraus absolute Proteinkonzentrationen zu errechnen, da verschiedene Eiweiße verschiedene Stickstoffgehalte haben können. Dies war in der vorliegenden Arbeit auch gar nicht nötig, weil bereits die Kenntnis allein des Stickstoffgehaltes der Kat1- bzw. Kat5-Lösungen für eine eindeutige Zuordnung des Unterschiedes in den Absorptionsspektren der beiden Katalasespezies genügte.

3242 Bestimmung der Konzentration von Kat1 und Kat5

Wie in 521 gezeigt werden konnte, hat die Soret-Bande (405 nm) von Kat1 und Kat5 gleiche Lage und Intensität. Damit ist auch der molare Extinktionskoeffizient bei 405 nm für Kat1 und Kat5 identisch und konnte zur Konzentrationsbe-

stimmung herangezogen werden. Da Ergebnisse dieser Arbeit (s. 5122 und 513 in Zusammenhang mit dem Hybridisierungsversuch) und anderer Autoren (48) ein Molekulargewicht von 240.000 für Katalase am wahrscheinlichsten erscheinen ließen, wurde der von Samejima und Yang (49) für dieses Molekulargewicht und die Wellenlänge 405 nm ermittelte Extinktionskoeffizient mit dem Wert $3,24 \times 10^5$ für alle spektroskopischen Konzentrationsbestimmungen nativer Rinderleberkatalase angewendet. Die von anderen Autoren (50, 51, 52, 53) angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten sind für andere Wellenlängen und/oder andere Molekulargewichte gerechnet und daher ungeeignet.

3243 Kohlehydratanalyse

Zum Nachweis von Kohlehydraten in Katalase wurde eine gaschromatographische Methode nach Clamp et al. (54) und Bhatti et al. (55) herangezogen.

Dazu wurde zunächst die prosthetische Gruppe des Enzyms nach der Methode von Schroeder et al. (56) entfernt. Das gefriergetrocknete Protein wurde dann noch weitere 24 Stunden im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxid aufbewahrt. 3 bis 8 mg des so behandelten Proteins wurden in ein Reagensglas, in dem sich als interner Standard Mannit (0,2-1 µMol) befand, eingewogen und mit 0,5 ml methanolischer Salzsäure (1,5 M) versetzt. Nachdem 30 sec hochgereinigter Stickstoff eingeleitet wurde, um die Luft zu entfernen, wurde das Reagensglas sofort zugeschmolzen und in einem Trockenschrank 18 Stunden lang bei 100 °C gehalten.

Nach dem Öffnen des Gefäßes mußte mit so viel Silbercarbonat neutralisiert werden, bis die CO_2 - Entwicklung aufhörte. Dann konnte der Inhalt des Reagensglases zur Acetylierung mit 0,1 ml Acetanhydrid p. A. versetzt werden. Das verschlossene Gefäß wurde anschließend mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die ungelösten Bestandteile des Reaktionsgemisches durch Zentrifugation entfernt und die überstehende Flüssigkeit in ein kleines Plastikgefäß mit spitzem Boden (Reaktionsgefäß 3800 der Fa. Eppendorf) überführt. Der Rückstand wurde daraufhin dreimal mit je 1 ml Methanol p. A. extrahiert und die Extrakte mit dem nach der Zentrifugation erhaltenen Überstand vereinigt. Diese Lösung wurde schließlich am Rotationsverdampfer getrocknet.

Zur Silylierung wurden die vereinigten und wenigstens 12 Stunden im Vakuumexsiccator über P_2O_5 getrockneten Extrakte in einem mit Schraubverschluß und Septum versehenen kleinen Gefäß mit 0,1 ml Silylierungsgemisch (1 ml Pyridin p. A. (über CaH_2 im Dunklen aufbewahrt) + 0,2 ml Trimethylchlorsilan (TMS) + 0,2 ml Hexamethyldisilazan (HMDS)) versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 30 min konnte ein Ammoniumchloridniederschlag durch Zentrifugation entfernt und die überstehende Flüssigkeit der gaschromatographischen Analyse unterzogen werden.

Diese geschah mittels einer Apparatur von Hewlett-Packard, Modell "High Efficiency Gaschromatograph". Als Säule gelangte eine einmal gewendelte, u-förmige Glassäule mit einer Länge von 250 cm und einem Durchmesser von 0,32 cm zur Anwendung. Vor der Füllung wurde sie mit einer 1 %igen Lösung von Trimethylchlorsilan in Toluol silanisiert. Die Säulenfüllung bestand aus 3,8 % SE 30 auf Chromosorb W/80 - 100 mesh (Hewlett-Packard), hergestellt nach der "solution coating technique".

3244 Lipidanalyse

Zur Lipidanalyse wurden 2 Testkombinationen der Fa. Boehringer Mannheim verwendet, nämlich die "Biochemica Test Combination" für β-Lipoproteide und für Gesamtlipide.

Es wurden mehrere Analysen mit steigenden Katalasemengen (bis 50 mg) durchgeführt. Dabei zeigte keiner der beiden Teste eine positive Reaktion. Aufgrund der großen Menge des eingesetzten Untersuchungsmaterials und der Nachweisgrenze des Tests bedeutet dies, daß entweder keine oder weniger als ca. 0,4 % Lipide in Katalase enthalten sind.

3245 Analyse primärer Aminogruppen

Die Bestimmung von Aminogruppen von Kat1 und Kat5 wurde nach Fields (57) mit 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) bei Zimmertemperatur

und in Anwesenheit von Sulfit vorgenommen. Dabei entstand ein roter Sulfitkomplex der trinitrophenylierten Aminogruppen, der bei 420 nm gemessen wurde. Fields gibt für das mit ε-Aminogruppen (Lysin) gebildete Reaktionsprodukt einen molaren Extinktionskoeffizienten von 19.200 an. Auch Thiolgruppen reagieren mit dem Reagens, u. z. mit 30 - 50 mal höherer Geschwindigkeit. Der molare Extinktionskoeffizient dieser Verbindung beträgt jedoch nur 2.250 und kann bei Kenntnis des Sulfhydrylgehaltes zur Korrektur herangezogen werden.

Die Konzentrationen von Kat1 und Kat5 (gelöst in 0,01 M Phosphat, 0,2 M NaCl pH 8,0) wurden spektroskopisch bei 405 nm bestimmt. Sie betrugen 1,72 mg/ml für Kat1 und 2,09 mg/ml für Kat5. Da der Verlauf der Reaktion bei einer Wellenlänge (420 nm) verfolgt wurde, bei der Katalase selbst noch eine starke Absorption zeigt, mußten die Extinktionen der Katalaselösungen an diesen Stellen bestimmt und bei der Berechnung der Aminogruppen durch Subtraktion von den nach der Farbstoffbildung entstandenen Extinktionen berücksichtigt werden. Zur Ausführung der Reaktion wurden in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm 0,5 ml Katalaselösung mit 0,5 ml Boratpuffer (0,1 M $Na_2B_4O_7$ pH 9,5 mit 0,1 M NaOH) und 20 μl 1,8 molarer 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäure versetzt und sofort durchmischt. Nach 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 M NaH_2PO_4, welches 1,5 mM Sulfit enthielt, gestoppt und die Extinktion bei 420 nm gemessen. In der Referenzküvette befand sich anstelle der Katalaselösung nur der Phosphatpuffer, in dem die Katalasen gelöst waren.

3246 Bestimmung der Sulfhydrylgruppen

Kat1 und Kat5 wurden sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand auf ihren Gehalt an Thiolgruppen nach einer von Ellman (58) beschriebenen Methode mit 5, 5'-Dithiobis- (2-nitrobenzoesäure) (DTNB) untersucht. Die Extinktion des Reaktionsproduktes (5-Thio-2-nitrobenzoat) wurde bei 412 nm gemessen und der von Ellman angegebene Wert für den molaren Extinktionskoeffizienten von 13.600 ermöglichte die Berechnung der Sulfhydrylgruppen des Enzyms.

Da Heidrich (33) zeigen konnte, daß durch Einwirkung von DTT auf Rinderleberkatalase fast reine Kat1 entsteht, und er als Erklärung hierfür eine Reduktion von Disulfidbrücken vorschlug, wurde zur Überprüfung dieser Hypothese käufliche Rinderleberkatalase (2 mg/ml) mit DTT behandelt (0, 1 % DTT, 2 Stunden bei 37°C). Die elektrophoretische Analyse zeigte, daß danach neben geringen Mengen Kat2 nur noch Kat1 vorhanden war. Die präparative Reindarstellung des Kat1-Anteils geschah anschließend durch Ionenaustauschchromatographie, wie unter 312 beschrieben. Die Fraktionen des Eluates enthielten zu ca. 40 % reine Kat1 (im folgenden als Kat1 (DTT-behandelt) bezeichnet).

Zur Durchführung der SH-Analyse wurden die Proteine gegen einen Tris-Puffer (0, 05 M Tris, 0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 0 mit HCl) unter dreimaligem Pufferwechsel dialysiert. Die Konzentration von Kat1 war 0, 72 x 10^{-5}M, die von Kat1 (DTT-behandelt) 0, 81 x 10^{-5}M, Kat5 wies 0, 87 x 10^{-5} Mol/l auf. Das Reagens wurde durch Lösen von 20 mg DTNB in 1 ml Tris-Puffer (0, 5 M Tris-HCl pH 8, 0) bereitet. Zur Messung der im nativen Zustand erfaßbaren Thiolgruppen wurde 1 ml Kataloselösung in eine Küvette (1 cm Schichtdicke) pipettiert. Die Vergleichsküvette enthielt 1 ml des Puffers. Dann wurden 10 µl der Reagenslösung zuerst in die Referenzküvette, anschließend die gleiche Menge zur Proteinlösung gegeben und nach sofortiger Durchmischung die Extinktion bei 412 nm gemessen. Wie bei der Bestimmung der freien Aminogruppen mußte auch hier die Eigenabsorption, die Katalase bei 412 nm hat, und die eine wesentlich höhere Extinktion und damit einen zu hohen Sulfhydrylgehalt vortäuschen würde, berücksichtigt werden. Dies geschah in der gleichen Weise, wie es bei 3245 beschrieben wurde.

Die "verborgenen", im Inneren des Moleküls befindlichen Thiolgruppen wurden dem Reagens durch Auffaltung des nativen Moleküls mit 4 M Gu·HCl zugänglich gemacht. Zu diesem Zweck wurden 0, 5 ml Kataloselösung mit 0, 5 ml stickstoffgesättigter 8 M Gu·HCl-Lösung (8 M Gu·HCl, 0, 05 M Tris, 0, 1 M NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 0) vermischt und 5 min bei Zimmertemperatur belassen. Auf diese Weise wurde auch die Referenzlösung hergestellt. Die weitere Analyse geschah wie oben geschildert.

3247 Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide von Kat1 und Kat5

Um Aufschluß über Gleich- oder Verschiedenheit der Primärstruktur zweier Proteine zu erlangen, kann der Vergleich ihrer tryptischen Peptide oft wertvolle Dienste leisten. Die in dieser Arbeit verwendete Variante der säulenchromatographischen Peptidauftrennung nach Machleidt et al. (59) zeichnete sich durch hohes Auflösungsvermögen aus und hatte außerdem noch den Vorteil, mit Peptidmengen im n Mol-Bereich auszukommen.

Je 5 mg von Kat1 und Kat5 wurden 10 min lang bei 90 °C im Wasserbad denaturiert. Die wässrigen Lösungen änderten dabei ihre Farbe von dunkelbraun nach rostbraun, die Proteine blieben jedoch in Lösung. Anschließend wurden die Katalaselösungen mit der gleichen Menge 1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 8, 6 versetzt und zur tryptischen Verdauung bei 37 °C mit 1 % TPCK-Trypsin (bezogen auf das zu spaltende Eiweiß) versetzt. Nach jeweils 2 Stunden erfolgte noch zweimal Zugabe gleicher TPCK-Trypsinmengen. Die Peptide wurden anschließend im Vakuum über KOH und H_2SO_4 getrocknet und wieder in 0, 1 M Citratpuffer pH 2, 75 gelöst. Unlösliche Peptide konnten durch Zentrifugation entfernt werden. Die Auftrennung der Peptide vollzog sich durch automatische Chromatographie an einer Kapillarsäule (0, 1 x 50 cm), die mit dem Kationenaustauscher Aminex A 6 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) gefüllt war. Die Säule wurde bei 50 °C mit einem kombinierten Salz- und pH-Gradienten eluiert, der durch kontinuierliche Zumischung von Natronlauge zum Elutionspuffer (Na-citrat) erzeugt wurde (s. (59)). Die eluierten Peptide konnten durch laufende Zuführung einer 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäurelösung angefärbt und mittels einer Durchflußküvette bei 334 nm spektroskopisch registriert werden.

3248 Aminosäureanalyse

Die quantitative Aminosäureanalyse wurde mit einem Technicon-TSM-Analysator durchgeführt. Etwa 0, 5 mg gereinigte, salzfreie und lyophilisierte Kat1 bzw. Kat5 wurden in redestillierter 6 N HCl aufgenommen und 20 Stunden lang bei 105 °C in stickstoffgespülten, evakuierten und zugeschmolzenen

Glasröhrchen hydrolysiert. Anschließend konnte die Salzsäure am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Puffer aufgenommen werden. Entsprechende Volumina wurden an zwei verschiedenen Säulen im Analysator auf ihren Gehalt an neutralen und sauren bzw. an basischen Aminosäuren quantitativ untersucht.

Da Cystein und Cystin bei der sauren Hydrolyse des Proteins teilweise zerstört werden, wurden sie vorher zur stabilen Cysteinsäure oxydiert. Dies geschah nach einer von Blackburn (60) beschriebenen Methode mit Hilfe von Perameisensäure.

Tyrosin und Tryptophan wurden spektroskopisch nach Edelhoch (61) bestimmt, da auch diese Aminosäuren säurelabil sind.

Die Auswertung der Diagramme erfolgte entweder durch Integration aus Höhe und Breite der Banden oder durch Ermittlung der Peak-Flächen mittels eines Planimeters.

3249 Gelfiltration in Anwesenheit von 8 M Harnstoff

Zur Anwendung der Gelchromatographie für die Größen-, Gestalts- und Molekulargewichtsbestimmung biologischer Makromoleküle sowie wegen der Meßgrößen sei auf die umfangreiche Übersichtsliteratur (62, 63, 64) verwiesen.

Als charakteristische Parameter von Substanz und Referenzproteinen wurden die Elutionsvolumina V_e an den Maxima der Elutionskurven bestimmt. Das Elutionsvolumen bzw. die abgeleiteten Größen sind ein Maß für die räumliche Ausdehnung (62) bzw. Sperrigkeit der Proteinkomponente. Für homologe Reihen, z. B. für alle globulären Proteine, sind theoretisch und praktisch in einem mittleren Trennbereich logarithmische Abhängigkeiten der Molekulargewichte von den Elutionsvolumina gefunden worden:

$$V_e = k \times \lg M \qquad (23)$$

Die Sperrigkeit als elutionsbestimmende Größe wird jedoch bei Proteinen

unterschiedlicher Gestalt besser durch den Stokesschen Radius einer äquivalenten hydrodynamischen Kugel charakterisiert als durch ihr Molekulargewicht. Bei Anwesenheit gewisser denaturierender Agentien (Harnstoff, Gu·HCl) besteht jedoch eine allgemeingültige Beziehung zwischen dem Molekulargewicht und dem Elutionsvolumen (65, 66). D. h. das Molekulargewicht eines Proteins (bzw. seiner Untereinheiten) kann aus dem Vergleich seines Elutionsvolumens mit dem bekannter Proteine bestimmt werden.

Zur Vorbereitung des Versuches wurde Sephadex G 200 Medium (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in einem Puffer, der 8 M Harnstoff, 0,1 % β-Mercaptoäthanol, 13,6 g Tris und 4,5 g Borsäure pro Liter enthielt, aufgeschlämmt und über Nacht unter Rühren gequollen. Anschließend wurden 30 mal die "fines" entfernt. Diese Behandlungsweise garantierte eine brauchbare Durchflußgeschwindigkeit des Elutionspuffers, ohne daß die Säule verstopfte. Vor dem Einfüllen des Gels in das Chromatographierohr (Länge 50 cm, Durchmesser 2,5 cm) mußte es an der Wasserstrahlpumpe gründlich entgast werden, um ein späteres Entstehen von Luftblasen zu verhindern. Die zur Hälfte mit Puffer gefüllte Säule wurde dann in einem Zug mit dem vorbereiteten Gel gefüllt; dabei wurde das Säulenvolumen mit einem weiten, aufgesteckten Trichter vergrößert. Zur sauberen Packung des Gels wurde nach ca. einer halben Stunde der Auslaufschlauch geöffnet und so befestigt, daß eine Niveaudifferenz von 10 - 15 cm entstand. Das im Trichter befindliche Gel mußte durch einen Rührer in Bewegung gehalten werden, damit es leicht in die Säule gelangen konnte. Eine langsam aufsteigende horizontale Oberfläche der Gelfüllung zeigte eine homogene Packung an. Nach Beendigung der Säulenfüllung wurde noch 72 Stunden lang Elutionspuffer mit einer Geschwindigkeit von 5,7 ml pro Stunde durch die Säule gepumpt.

Die Proteine wurden in einem Puffer gelöst, der dem Elutionspuffer bis auf den β-Mercaptoäthanolgehalt (1 %) völlig gleich war. Nach Zugabe von Saccharose und der dadurch erhöhten Dichte konnten die Proben leicht durch Unterschichten auf die Geloberfläche in einer scharfen Zone aufgetragen werden. Die absteigende Chromatographie geschah dann bei einer Temperatur von 20 °C und einer Durchflußrate von 5,7 ml pro Stunde. Das Eluat wurde mittels einer Durchflußküvette spektroskopisch bei 280 nm auf seinen Proteingehalt hin untersucht und durch einen Fraktionsteiler in drei Fraktionen pro Stunde unterteilt.

Zur Verhinderung von Fehlern in der Messung der Elutionsvolumina (z. B. durch

Änderung der Gelpackung) wurde bei jedem Lauf Blue Dextran 2000 (Molekulargewicht 2 Mio) zur Probe gegeben. Dieses lief im Ausschlußvolumen V_0. Der Quotient V_e/V_0 diente als charakteristische Meßgröße der einzelnen Proteine und wurde zur Erstellung einer Eichkurve herangezogen.

32410 Hybridisierung von Kat1 mit Kat5

Nach den bisherigen Kenntnissen über Hybridisierungsversuche an Proteinmolekülen mit mehreren nicht kovalent verbundenen Untereinheiten weiß man, daß diese unter den angewandten Bedingungen in ihre nativen Untereinheiten zerfallen und sich dann statistisch wieder zum meist noch physiologisch wirksamen Molekül zusammenfinden.

Zur Hybridisierung wurden Kat1 und Kat5 (0,5 mg/ml) in 0,05 M Tris, 1,0 M NaCl pH 7,9 (HCl) gelöst. Sowohl diese Lösungen als auch ein Gemisch gleicher Teile dieser Lösungen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, über Nach bei -25°C gelagert und dann 20 min lang im Wasserbad bei 37,5°C gehalten. In einem anderen Versuch wurden obige Katalaselösungen lediglich über Nacht bei Zimmertemperatur belassen. Die Katalaselösungen wurden anschließend elektrophoretisch (s. 3211) untersucht.

4 Biophysikalische Methoden

41 Optische Methoden

411 Meßgrößen

Die Absorption bzw. Extinktion, die Optische Rotationsdispersion (ORD) und der Circulardichroismus (CD) sind Meßgrößen, die gewisse Aussagen über bestimmte Bestandteile, Gruppen oder Strukturmerkmale von Proteinen u. ä. ermöglichen (67 - 71).

Die Schwächung von Licht der Intensität I_0 beim Durchgang durch absorbierende Materie gehorcht dem Beerschen Gesetz nach

$$I = I_0 \cdot 10^{-E} \qquad (24)$$

Die Extinktion E ist dem molaren Extinktionskoeffizienten ε_M verbunden durch

$$\varepsilon_M = E / d \cdot c \qquad (25)$$

wobei c die Konzentration in Mol/l und d die Schichtdicke in cm ist.

Die spezifische Drehung $[\alpha]$ einer optisch aktiven Substanz, welche sich in Lösung befindet, ist bei einer bestimmten Wellenlänge λ in folgender Weise definiert:

$$[\alpha]_\lambda = 100\,\alpha / c' \cdot d \qquad \left[\frac{\text{Grad dl}}{\text{g dm}}\right] \qquad (26)$$

c' steht für die Konzentration in Gewichtsprozenten, d für die Schichtdikke in dm und α für den gemessenen Drehwert in Grad.

Die molare Drehung $[R]$ bei der Wellenlänge λ ist gegeben durch

$$[R]_\lambda = [\alpha]_\lambda \cdot \bar{M} / 100 \left[\frac{\text{Grad cm}^2}{\text{Dezimol}}\right] \qquad (27)$$

mit $\bar{M}$ als mittlerem Molekulargewicht pro Aminosäurerest.

Die absoluten Werte der reduzierten mittleren Restdrehung $[R']$ können durch Einführung des Korrekturgliedes $3/n^2 + 2$, in welchem der Brechungsindex n auftritt, berechnet werden:

$$[R'] = \frac{3}{n^2+2} \cdot [\alpha] \cdot \frac{\bar{M}}{100} \qquad \left[\frac{\text{Grad cm}^2}{\text{Dezimol}}\right] \qquad (28)$$

Die absoluten Werte der mittleren Restelliptizität Θ sind definiert durch die Gleichung:

$$[\Theta] = [\alpha] \frac{\bar{M}}{100} \qquad \left[\frac{\text{Grad cm}^2}{\text{Dezimol}}\right] \qquad (29)$$

412 α-Helixgehalt

Aus den Messungen der Optischen Rotationsdispersion bzw. des Circulardichroismus können für Proteine bei bestimmten Wellenlängen Abschätzungen

des Gehalts an bestimmten Strukturen vorgenommen werden.(68, 69, 70). Die folgenden Interpolationsformeln wurden zur Abschätzung des α-Helixgehaltes herangezogen:

Helixgehalt [%]	$\cong -([R']_{233\,nm} + 1800) / 109$	(30)	(72, 73)
	$\cong -([\Theta]_{222\,nm} - 1800) / 454$	(31)	(74)
	$\cong -([\Theta]_{210\,nm} + 2200) / 362$	(32)	(74)
	$\cong -([\Theta]_{223\,nm} - 2830) / 418$	(33)	(75)

Andere Auswertungen der ORD-Kurven, z. B. nach der Methode von Moffit und Yang (76), wurden wegen ihrer offensichtlichen Beschränkungen (75), insbesondere bei kleinerem α-Helixgehalt, nicht vorgenommen.

413 Spektrophotometrische Titration zur Bestimmung der "freien" und "verborgenen" Tyrosinreste

Wenn gelöste, tyrosinhaltige Proteine vom neutralen Medium durch Zugabe von Alkali in ein basisches Medium überführt werden, so findet eine Ionisierung der Tyrosine statt. Diese kann anhand der Extinktionszunahme der Lösung bei 295 nm gemessen werden. Erfolgt die pH-Erhöhung stufenweise, so werden zuerst die an der Oberfläche des Moleküls befindlichen, sogenannten "freien" Tyrosine ionisiert(entsprechend dem pK-Wert von Tyrosin, welcher bei 10, 0 liegt (77)). Bei weiterer Alkalizunahme erfolgt Auffaltung des Proteins, so daß auch die im Inneren des Moleküls befindlichen "verborgenen" Tyrosine ionisiert werden können. Anhand dieser Methode lassen sich also Aufschlüsse über die räumliche Anordnung der Tyrosine in einem Eiweißmolekül gewinnen und damit u. U. auch über dessen Struktur bzw. eventuelle Strukturänderungen (78, 79).

Zur Durchführung des Experimentes wurden Kat1 bzw. Kat5 gegen 0, 2 M NaCl pH 7, 5 dialysiert und die Lösungen stufenweise mit 0, 1 N bzw. 2 N NaOH alkalisch gemacht. Unmittelbar nach jeder Alkalizugabe wurden sowohl die Extinktion als auch der pH-Wert der Lösung gemessen. Eine zweite Messung dieser beiden Größen erfolgte 10 min nach Alkalisierung.

Die pH-Messungen wurden mit dem pH-Meter 26 (Radiometer, Kopenhagen) und der Einstabglaselektrode GK 2301 C durchgeführt. Diese war zuvor sorgfältig mit neuen pH-Eichlösungen bis zu pH 13 geeicht worden.

414 Spektroskopische Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan

Nach Edelhoch (61) kann Tyr neben Try und Cystin spektroskopisch bestimmt werden. Dazu wurde das Protein in 6 M GuHCl pH 6, 5 gelöst (unter völliger Auffaltung) und die Extinktion dieser Lösung bei 295 und 300 nm gemessen. Durch Zugabe eines bestimmten Volumens 4 M KOH wurde sodann der pH-Wert der Proteinlösung auf 12, 5 erhöht und die durch Ionisation der Tyrosine angestiegene Extinktion bei 295 und 300 nm registriert. Aus der Zunahme der molaren Extinktionskoeffizienten bei den angegebenen Wellenlängen (die molaren Extinktionsänderungen werden von Edelhoch mit 2480 bei 295 nm bzw. 2270 bei 300 nm angegeben) ließ sich der Tyrosingehalt ermitteln.

Die Anzahl der Tryptophanreste pro Molekül errechnet sich nach Edelhoch aus folgender Beziehung:

$$N_{Try} = \varepsilon_{288} / 3103 - \varepsilon_{280} / 10318 \qquad (34)$$

ε_{288} bzw. ε_{280} wurden aus der 6 M Gu-HCl-Proteinlösung von pH 6, 5 bestimmt.

415 Spektroskopische Geräte

Die Extinktionsmessungen wurden entweder mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II oder mit dem registrierenden Spektralphotometer Cary Modell 15 (Varian, Monrovia, USA) durchgeführt. Die Messungen der Optischen Rotationsdispersion und des Circulardichroismus erfolgten mit dem registrierenden Spektralpolarimeter Cary Modell 60, wobei für die CD-Messungen ein Zusatz, nämlich Cary Modell 6002, nötig war. Auch die beiden letztgenannten Geräte waren von der Fa. Varian, Monrovia, USA.

Die benützten Küvetten waren thermostatisierbar und von unterschiedlicher Schichtdicke und stammten entweder von der Firma Perkin Elmer, Bodenseewerk, Überlingen oder von der Firma Hellma, Mühlheim, Baden.

42 Röntgenkleinwinkelstreuung

421 Einleitung

Bei der Röntgenkleinwinkelstreuung (RkWS) biologischer Makromoleküle in verdünnter Lösung können Molekülparameter aus der Winkelabhängigkeit und der absoluten Intensität der Streuung und aus bestimmten charakteristischen Konstanten der Streukurve entnommen werden. Diese Parameter erlauben u. a. die Berechnung von Molekulargewicht, Volumen und Form eines Moleküls. Im folgenden soll neben der Angabe der für die Bestimmung der Molekülparameter wichtigen Formeln eine etwas ausführlichere Kurvendiskussion stehen. Dabei wird im wesentlichen Bode (138) sowie den Monographien von Mittelbach (80) und Kratky (81, 82) gefolgt.

Wird ein Objekt einer Röntgenstrahlung ausgesetzt, so schwingen die Elektronenhüllen der Atome im Rhythmus der einfallenden Welle mit und senden Sekundärwellen aus. Das Studium der Interferenz dieser Sekundärwellen ist der wesentliche Inhalt der Röntgenfeinstrukturanalyse. Da sich bei allen Streuungsvorgängen die Größe des streuenden Objekts und die Streuungswinkel entgegengesetzt zueinander verhalten, liefern Makromoleküle wie die behandelten Proteine Streuungseffekte bei entsprechend kleinen Winkeln, also eine "Kleinwinkel"-Streuung. Unter der Streukurve einer Partikelform ("Partikelstreuung" nach Guinier (83)) wird eine von interpartikulären Interferenzeffekten freie Kurve verstanden (erhältlich durch Extrapolation auf unendliche Verdünnung), bei der über alle räumlichen Orientierungen des Moleküls relativ zum Röntgenstrahl gemittelt wurde.

422 Streuverhalten dreiachsiger Körper endlicher Dimension

Porod et al. (84) haben erstmals Streukurven dreiachsiger Körper berechnet (vergl. vorhergehende Literatur über zweiachsige Körper (80)). Diese Be-

rechnungen wurden von Mittelbach und Porod bis zu sehr großen Streuwinkeln vorgenommen.

Im folgenden seien

2ϑ	der Streuwinkel
s	der Abstand des Meßpunktes vom Primärstrahlschwerpunkt in mm
a	der Abstand der Registrierebene vom streuenden Präparat gleich 21,3 cm
λ	die Wellenlänge des monochromatisierten Röntgenlichtes (Cu-K_α -Linie $\lambda = 1,54$ Å)
I	die Streuung in willkürlichen Intensitätseinheiten
I_o	die Streuintensität extrapoliert auf den Winkel $\vartheta = 0$
h	die Winkelvariable mit $h = 4\pi \sin\vartheta/\lambda$

Eine Auftragung von I oder I/I_o gegen h ist vorteilhaft, da h in den theoretischen Funktionen als Parameter erscheint. Experimentelle Kurven werden meist gegen die direkt zugänglichen Größen s oder ϑ aufgetragen. Für kleine Winkel gilt wegen

$$\begin{aligned} &\sin 2\vartheta \approx 2\vartheta \approx \operatorname{tg} 2\vartheta \approx s/a \\ &h \approx 4\pi\vartheta/\lambda \approx 2\pi s/\lambda \cdot a \end{aligned} \qquad (35)$$

Eine lineare Dimension L kann als praktisch unendlich groß angesehen werden, wenn sie mindestens so groß ist wie der größte mit der RkWS-Kamera auflösbare Braggsche Wert $\lambda/2\vartheta^*$ (mit $2\vartheta^*$ als kleinstem meßbaren Streuwinkel).

$$L \gg \lambda/2\vartheta^* \qquad (36)$$

Nach Guinier klingt die Streukurve eines jeden Teilchens mit endlichen Dimensionen im innersten Streuwinkelbereich wie eine Gaußsche Kurve ab (83):

$$I/I_o \approx e^{-(hR_\vartheta)^2/3} \qquad (37)$$

Diese Exponentialfunktion heißt die Guiniersche Näherung der Streukurve. R_s ist der Streumassenradius, formal in Analogie zum Trägheitsmassenradius der Mechanik definiert als Quadratwurzel aus dem mittleren quadratischen Abstand aller Streuzentren vom Ladungsschwerpunkt. Tab. 1 gibt eine Übersicht über Streumassenradien einfacher, regelmäßiger geometrischer Flächen und Körper, deren Streuäquivalenz mit den untersuchten Proteinen verglichen wurde.

Tabelle 1

Kugel mit Radius r	$R_s^2 = 3r^2/5$	(38)
Ellipsoid mit Halbachsen a, b und c	$R_s^2 = (a^2+b^2+c^2)/5$	(39)
Elliptischer Zylinder mit Höhe H und Halbachsen a, b	$R_s^2 = (a^2+b^2+H^2/3)/4$	(40)
Hohlzylinder mit Höhe H und den Radien r_i und r_a	$R_s^2 = (r_i^2+r_a^2)/2+H^2/12$	(41)
Kreiszylinder mit Höhe H und Radius r	$R_s^2 = (2r^2+H^2/3)/4$	(42)

Der Streumassenradius ist unabhängig von der Teilchenform definiert, so daß verschiedene räumliche Anordnungen der Streuzentren gleichen Streumassenradien zugeordnet werden können. Durch Logarithmieren und Einsetzen von Gl. 35 erhält man aus der Guiniernäherung Gl. 37

$$\ln \frac{I}{I_0} = \ln I(s) - \ln I_0 \approx -4\pi^2 R_s^2 s^2/3\lambda^2 a^2 \qquad (43)$$

Zur Bestimmung des Streumassenradius R_s eignet sich am besten die Guiniersche Auftragung der Streukurve (lgI (s) über s^2). Hierbei läuft die Streukurve gegen den Winkel 0 in eine Gerade aus, aus deren Neigung $tg\alpha$ sich R_s berechnen läßt gemäß:

$$R_s = 0.644\, a \sqrt{tg\alpha} \qquad (44)$$

Der Gültigkeitsbereich der Guiniernäherung - der Guinierbereich der Streukurve - ist abhängig von der Teilchenform und -größe. Eine gute Näherung auch bei größeren Winkeln stellt Gl. 37 nur für kugel- und

würfelähnliche Teilchen dar.

Mittelbach und Porod (85, 86, 87) haben für verschiedene dreiachsige regelmäßige Körper die Streuintensitäten in Abhängigkeit von h·r, h·R_s oder h·D angegeben, je nachdem ob Kugelmodelle (Kugelradius r), regelmäßige Körper (Streumassenradius R_s) oder allgemeinere Figuren (größte Querschnittsabmessung D) betrachtet werden. Die Intensität wird doppeltlogarithmisch gegen hr (bzw. hR_s oder hD) aufgetragen. Zum Vergleich mit diesen theoretischen Streukurven werden die experimentellen Streuintensitäten ebenfalls doppeltlogarithmisch (lgI/I_o gegen lgh bzw. lgs) aufgetragen und die resultierenden Kurven mit den theoretischen Streukurven im innersten (Guinierschen) Bereich zur Dekkung gebracht. Die Achsenlänge bzw. der Streumassenradius des zum Partikel streuäquivalenten Modellkörpers ist gleich dem s^*-oder h^*-Wert, der mit dem Nullpunkt der theoretischen lghR_s-Skala übereinstimmt, mit

$$D \text{ bzw.} R_s = 1/h^* = \lambda \cdot a / 2\pi s^* \qquad (45)$$

wegen lghR_s gleich Null.

423 Volumenberechnung

Zur Auswertung der experimentellen Streukurven sind diese meistens zuerst durch die sogen. Spalthöhen- oder Längsentschmierung vom Kollimationseinfluß zu befreien. Im folgenden seien unentschmierten Streukurven entnommene Größen mit einer Tilde gekennzeichnet (z.B. $\tilde{I}$).

Nach Porod (88) hängt in einem Zweiphasensystem der als Invariante bezeichnete Ausdruck

$$Q(h) = \int_0^\infty I h^2 \, dh = \frac{8\pi^3}{(\lambda \cdot a)^3} \int_0^\infty I s^2 \, ds \,, \qquad (46)$$

$$\text{wobei } \int_0^\infty I s^2 ds = Q(s), \qquad (47)$$

nur vom Gesamtvolumen der dispergierten Phase, nicht aber von ihrem Verteilungsgrad ab. Da die Intensität beim Winkel Null der Teilchengröße proportional ist und gerade von der Verteilung abhängt, mißt der

Quotient aus I_o und Q das Volumen des Einzelteilchens:

$$V = \frac{2\, I_o \pi^2}{Q(h)} = \frac{I_o\, (\lambda a)^3}{4\pi} \cdot \frac{1}{\int_0^\infty I\, s^2\, ds} \qquad (48)$$

da a = 213 mm: $(\lambda a)^3 / 4\pi = 2,81 \times 10^6 \left[mm^3 \times \text{Å}^3\right]$ (49)

Das Volumen errechnet sich also nach der Gleichung:

$$V = 2,81 \times 10^6 \cdot \frac{I_o}{Q(s)} \left[\text{Å}^3\right] \qquad (50)$$

Die Invariante kann auch der mit Längsverschmierung behafteten Streukurve entnommen werden nach

$$\tilde{Q} = \int_0^\infty \tilde{I} \vartheta \, d\vartheta = 1/2\, Q \qquad (51)$$

Das Volumen ergibt sich dann zu:

$$V = 2,81 \times 10^6 \cdot \frac{\tilde{I}_o}{2\tilde{Q}} \left[\text{Å}^3\right] \qquad (52)$$

424 Die Röntgenkleinwinkelstreuanlage

4241 Energie- und Kameraanlage

Ein Gleichspannungs-Röntgengenerator (Philips) diente zur Speisung einer wassergekühlten, hochstabilisierten 1400 W-RkWS-Feinstruktur-Kurzfokus-Röntgenröhre (Sonderanfertigung der Fa. Siemens für Kratky-Kameras) mit sich öffnendem Strahl. Gemessen wurde mit 36 kV und 36 mA und zur Vermeidung von Inkonstanzen im thermostatisierten Raum (20 °C ± 0,2 °C). RkWS-Messungen sind häufig bis zu sehr kleinen Winkeln durchzuführen. Dazu ist vor allem die Unterdrückung der Streuung der dem Primärstrahl begrenzenden Blenden nötig. Dies gelingt optimal mit einer von Kratky (89) angegebenen und entwickelten Blendenordnung, wie sie auch die benutzte, von der Paar KG, Graz, Österreich, gebaute Anlage besaß (s. Aufbauanleitungen der Firma).

Die Kamera besitzt einen Satz verschieden großer Eintrittsspalte. Die Temperierung der Küvette quadratischen Querschnitts von 1 mm^2 auf 4 °C erfolgte mittels einer temperierbaren Küvettenhalterung.

Zur Registrierung der Cu-Kα -Streustrahlung (λ = 1, 54 Å) wurde ein Xenon-Proportionalzählrohr (Siemens, Typ E) mit einer Quantenausbeute von 70 % im Bereich von 1, 5 - 3 Å verwendet. Dieses wird durch ein Schrittschaltwerk durch den Winkelbereich gedreht. Die energieproportionalen Impulse gelangen vom Detektor über Vor- und Linearverstärker zum Differential-Integral-Diskriminator. Hier erfolgt eine nachträgliche Monochromatisierung durch Aussiebung der Impulse. Diese werden in einem Zählgerät (Typ Z-1000) registriert und ausgedruckt. Zur Einstellung der Diskriminatorhöhe und -breite wurde die Impulshöhenverteilung aufgenommen.

4242 Justierung der Blendensysteme

Die Justierung der Kamera wurde entsprechend der Aufbau- und Justieranleitung der Paar KG vorgenommen. Die benutzte Primärstrahlbreite war 0, 4mm, die Länge des Primärstrahlbündels in der Registrierebene etwa 40 mm, gemessen mit einem verschiebbaren, senkrechten Zählrohrspalt von 0, 5 mm Breite (Abb. 4). Der Zählrohrspaltnullpunkt wurde ebenfalls bestimmt.

Der Schwerpunkt des Primärstrahlbreitenprofils als Bezugspunkt für den Winkel Null wurde nach Extrapolation auf die Zählrohrspaltbreite Null bestimmt (90). Der Streuwinkel wurde vom Primärstrahlschwerpunkt zur Zählrohrspaltmitte gerechnet. Bei allen Messungen wurden eine Eintrittsspaltbreite E von 80 μ und eine Zählrohrspaltbreite von 200 μ gewählt. Die Auflösung der Kamera wurde bis zu s = 0, 3 mm entsprechend einem größten Braggschen Wert (Gl. 36) von etwa 1100 Å anhand der Streukurve einer zur Eichung freundlicherweise von Prof. Dr. Kratky überlassenen Lupolenfolie geprüft und mit der gefüllten Küvette verglichen. (Abb. 5). Trotz kaum vorhandener Blendenstreuung wurden die Messungen erst bei einem Winkel von s = 0, 5 mm begonnen entsprechend einer größten Auflösung von etwa 550 Å.

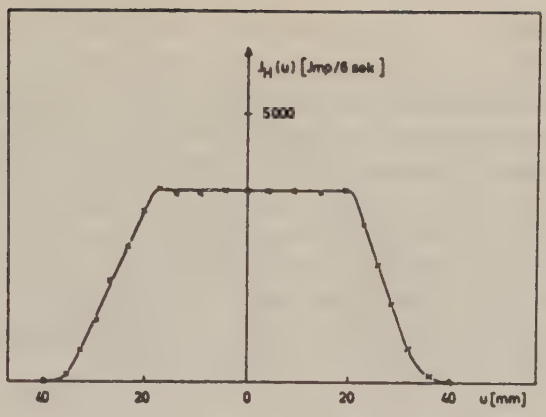


Abb. 4 Längsprofil des Primärstrahls in der Registrierebene. Intensität als Funktion des Ortes.

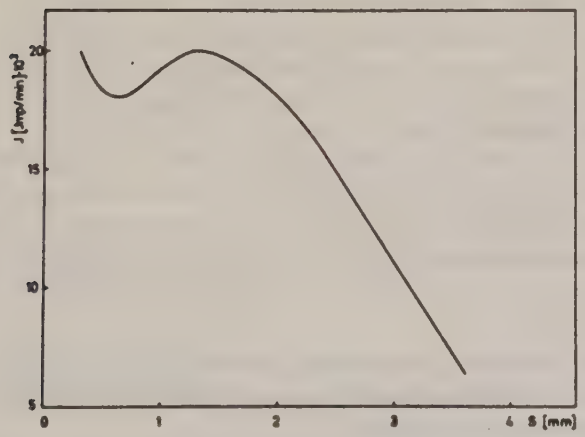


Abb. 5 Lupoleneichkurve

425 Entschmierung

4251 Allgemeines

Bei der RkWS-Apparatur wird aus meßtechnischen und apparativen Gründen eine Spaltgeometrie benützt, mit der bei kleiner Breite des Primärstrahls gegenüber einer Punktgeometrie eine höhere Intensität erreicht wird. Außerdem wird ein strichförmiger, parallel zum Primärstrahlquerschnitt verlaufender Zählrohrspalt verwendet. Eine derartige Geometrie führt jedoch zu systematischen "Verschmierungen" der "wahren" Streufunktion. Die Zurückführung einer derart "verschmierten" Streukurve auf diese ideale theoretische Streufunktion wird als Entschmierung bezeichnet. (90, 91).

Nach Kratky (92) darf bei der Untersuchung der intensitätsschwachen Nebenmaxima unbedenklich im Hinblick auf die Breitenverschmierung die Primärstrahlbreite gleich der Halbwertsbreite des ersten Nebenmaximums genommen werden. (über Einfluß von Längen- und Breitenverschmierung s. (92)).

Bei der Entschmierung gehen Gaußkurven im allgemeinen wieder in Gaußkurven anderer Höhe, aber gleicher Breite über, die deshalb invariant gegenüber der Spalthöhenfunktion $i_H(u)$, d. h. der Intensitätsverteilung über den Strahlquerschnitt mit Laufvariablen u, ist. Bei "unendlich langem" Primärstrahl lassen sich deshalb Gaußkurven leicht graphisch entschmieren nach (92):

$$I_{Gauß} = \tilde{\gamma}_{Gauß} \sqrt{2,303 \quad tg\alpha/\pi} \qquad (53)$$

(nichtentschmierte Werte sind mit Tilde versehen; über die Steigung $tg\alpha$ der Endtangente s. 422).

Oft erweist sich eine Abspaltung und separate Entschmierung einer Gaußschen Kurve von der gemessenen Streukurve und die rechnerische Entschmierung der Restkurve als vorteilhaft.

4252 Das Spalthöhenkorrekturprogramm nach Hossfeld

Nach Hossfeld lassen sich durch Darstellung der entschmierten Streuverteilungen mit Hermiteschen Orthonormalfunktionen u. a. die geometrischen Auflösungsfehler quantitativ korrigieren. Das von ihm entwickelte Verfahren zur Korrektur des Spalthöheneffektes liefert als bisher einzige Methode die allgemeine Lösung des Problems unabhängig von der Art der Spalthöhenfunktion (s. (93)).

Zur Entschmierung wurde in dieser Arbeit ein Fortran IV- "Slit Height Correction"-Programm benutzt, das eine numerische Korrektur des Spalthöheneffektes bei beliebiger endlicher Spalthöhe zuläßt. Die Rechnungen wurden an der IBM 360/91 des Instituts für Plasmaphysik in Garching bei München durchgeführt.

Bei dem Programm wurde mit folgenden Eingabewerten gearbeitet:

a) Die verschmierten Streuwerte I (s) der auf Konzentration Null extrapolierten und auf 1 %ige Konzentration bezogenen Differenzstreukurve und die zugehörigen Winkelvariablen s. Die Streuwerte wurden in Schritten von 0, 2 mm von 0, 0 mm bis zu s = 10, 0 mm eingegeben.

b) Die Spalthöhenwerte I (u) und die zugehörigen Spalthöhenvariablen u_1 (Abb. 4) in Schritten zu 0, 2 mm.

c) Hossfeld verbessert in seinem Programm die Konvergenz der Reihenentwicklung u. a. durch eine Maßstabstransformation (93), die je nach Streufunktionsverlauf in der Dateneingabe optimalisiert werden kann. Die Entschmierungen wurden sowohl für gaußförmige (MUVA = 1) wie auch für einer homogenen Kugel (MUVA = 3) entsprechende Streukurven vorgenommen.

43 Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe des "negativ-staining"-Verfahrens können im Elektronenmikroskop große Proteinmoleküle direkt sichtbar gemacht werden, wobei bei geeigneter Konfiguration selbst die Anordnung von Untereinheiten erkannt werden

kann. Beim "negativ-staining"-Verfahren wird - im Gegensatz zum "positiv-staining" - das Trägermaterial mit Kontrastierungsmittel (Schwermetallsalze, elektronendicht!) beschichtet, und dieses Kontrastierungsmittel umschließt die abzubildenden Proteinmoleküle (elektronendurchlässiger!). Demzufolge wird ein Bild erhalten, bei dem der Elektronenstrahl im Kontrastierungsmittel absorbiert, beim Objekt aber durchgelassen wird (Negativeffekt).

Bei den vorliegenden Aufnahmen wurde ein Jem 100 B/2 Elektronenmikroskop (JEOL, Tokyo) mit 80 kV, einer Objektivgoldblende von 30 μ und einer Objektraumkühlung verwendet. Die Kontrastierungslösung bestand aus einer 0,5 %igen Uranyloxalatlösung pH 6,6. Die Konzentration der Proteinlösung war 0,5 mg/ml (0,1 M Ammonacetat, pH 7,0). Nach Mischen beider Lösungen im Verhältnis 1 : 20 wurde entweder aufgesprüht oder aufgetropft. Als Träger diente ein reiner Kohlefilm (Dicke ca. 100 Å), welcher von Glimmerplättchen in Wasser abgeschwemmt, mit Kupfernetzchen aufgefischt und dann leicht beglimmt wurde (zur Erzielung besserer Hydrophilie). Die Primärvergrößerung betrug 60.000. Die Aufnahmen wurden außerhalb des Scherzer-Fokusses gemacht, um besseren Kontrast (scharfe Abbildung des Molekülumrisses) zu erzielen. AGFA Scientia Film 23 D 56 wurde als Photomaterial benutzt.

5 Ergebnisse

51 Biochemische Charakterisierung von Kat1 und Kat5

511 Elektrophoretische Eigenschaften im nativen Zustand

5111 Discelektrophorese der an DEAE-Sephadex chromatographierten Katalase

Zur Darstellung von Kat1 und Kat5 wurde käufliche Rinderleberkatalase an einer DEAE-Sephadex-Säule chromatographiert. Normalerweise kann dabei nur eine Trennung der Substanzen erwartet werden, die bereits im aufgetragenen Gemisch enthalten waren. Die folgenden Abbildungen zeigen jedoch, daß bei Rinderleberkatalase noch zusätzliche, "neue" Proteine entstanden.

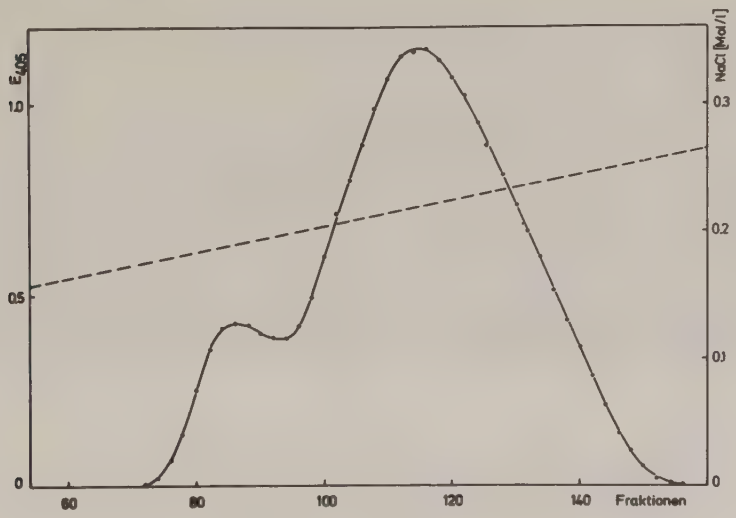


Abb. 6 Säulenchromatographische Auftrennung von Rinderleberkatalase an DEAE-Sephadex A 50. Die Elution erfolgte mittels eines linearen NaCl-Gradienten (-----).

Wie in Abb. 7 zu sehen ist, enthielt das Ausgangsmaterial 3 verschiedene Fraktionen, nämlich Kat3, Kat4 und Kat5. Kat1 bzw. Kat2 waren nicht vorhanden. Die Ionenaustauschchromatographie ergab nur 2 Gipfel im Elutionsdiagramm, die nicht sehr deutlich voneinander getrennt waren. Die elektrophoretische Untersuchung (Abb. 7) zeigte jedoch ein überraschendes Bild: Nicht nur Kat3, Kat4 und Kat5, also die ursprünglich aufgetragenen Proteine, sondern auch Kat1 und Kat2 waren im Eluat der Säule enthalten. Dieser Vorgang war auch zu beobachten, wenn reine Kat5 der Chromatographie unterworfen wurde. Auch in diesem Fall konnten im Eluat sämtliche 5 Katalasespezies nachgewiesen werden!

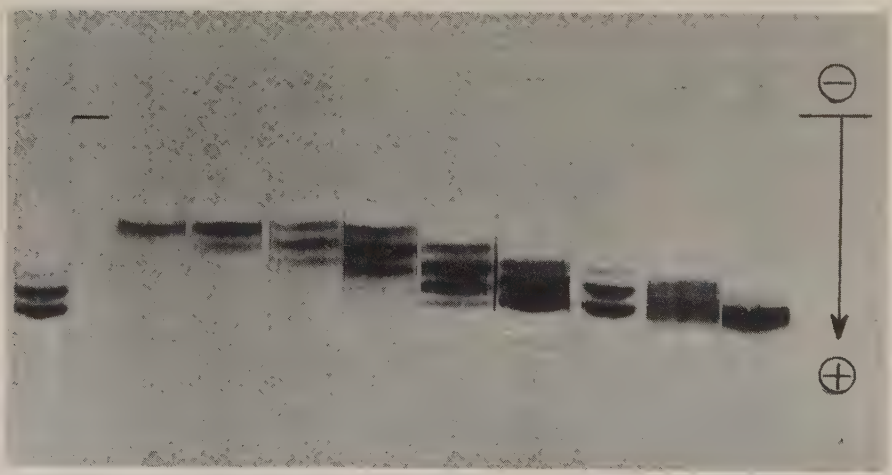


Abb. 7 Discelektrophorese der an DEAE-Sephadex chromatographierten Rinderleberkatalase.
V.l.n.r.: Ausgangsmaterial, Fraktion 84, 92, 100, 104, 110, 122, 126, 130, 136 des Eluats.

5112 Isoelektrische Punkte von Kat1 und Kat5

Da die Acrylamidgelelektrophorese Proteine sowohl nach ihrer Oberflächenladung als auch in (geringerem) Maße nach ihrer Größe separiert, kann nicht entschieden werden, ob sich Kat1 und Kat5 nur in ihrer Oberflächenladung oder nur in ihrer Größe oder in beidem unterschieden. Mit der Elektrofokussierung steht jedoch eine Methode zur Verfügung, die Proteine nur nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP), welcher sich von der Ladung ableitet, und nicht nach ihrer Größe trennt. Wenn sich Kat1 und Kat5 also nicht trennen würden und damit gleiche isoelektrische Punkte hätten, so läge die Vermutung nahe, daß sie sich nur in der Größe ihrer Moleküle unterscheiden (z. B. durch Aggregation).

In Abb. 8 sind die fraktionsweise gemessenen Absorptions- (bei 405 nm) und pH-Werte jeweils gegeneinander aufgetragen.

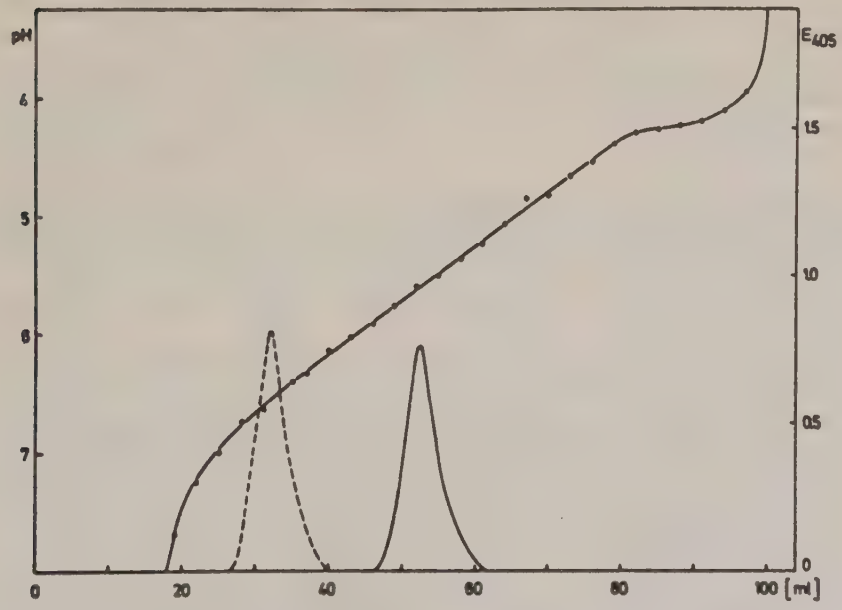


Abb. 8 Elutionsdiagramm der elektrofokussierten Kat1 (-----) und Kat5 (———). (•—•—•) = pH-Gradient. Versuchsbedingungen s. Text.

Wie zu ersehen ist, haben sich die beiden Katalasespezies in 2 scharfe Zonen getrennt. Die Ergebnisse von Discelektrophorese und Ionenaustauschchromatographie lassen erwarten, daß der IP von Kat5 mehr im Sauren liegt als der von Kat1. Dies wird auch durch diesen Versuch bestätigt. Für Kat1 ergab sich der IP bei pH 6,55 , für Kat5 liegt der IP bei pH 5,6. Die beiden Proteinen haben also einen Unterschied in ihren isoelektrischen Punkten von 0,95 pH-Einheiten.

5113 Bestimmung der Oberflächennettoladungen von Kat1 und Kat5 mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese

Es wurde die Ablenkung von Kat1 und Kat5, gelöst in Tris-Acetat-Puffer von pH 8,5, bei verschiedenen Pufferkonzentrationen gemessen. Als Bezugspunkt diente ein neutraler Farbstoff (N-2,4-Dinitrophenyläthanolamin), der nicht abgelenkt wurde (s. Abb. 3).

Da die Ausbildung der elektrischen Doppelschicht, und damit letzten Endes die elektrophoretische Beweglichkeit, in hohem Maße von der Art und der Konzentration der umgebenden Pufferionen abhängig ist, mußten die Eigenschaften des verwendeten Puffers in Bezug auf die Dissoziation seiner Bestandteile bei verschiedenen Konzentrationen untersucht werden. Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit und der Gefrierpunktserniedrigung von der Konzentration (Tris plus Essigsäure) der gelösten Substanz. Aus der zu ersehenden Linearität geht hervor, daß die Pufferbestandteile bei allen Konzentrationen des verwendeten Bereichs völlig dissoziiert waren.

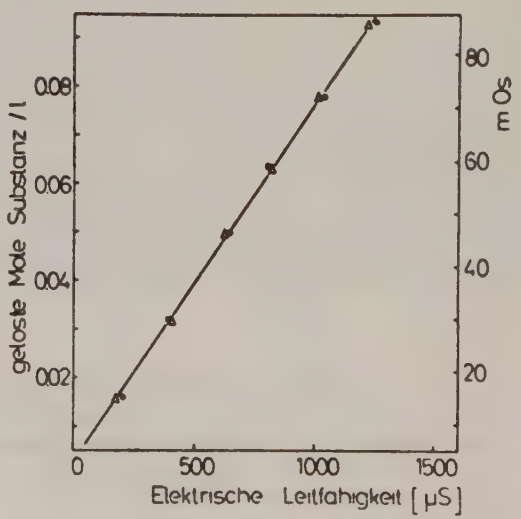


Abb. 9 Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit (△) und der Gefrierpunktserniedrigung (•) von der Konzentration des Tris-Acetatpuffers

Es herrschten also in Bezug auf Ionenstärke stöchiometrische Bedingungen, was die Berechnungen wesentlich vereinfachte.

In der folgenden Tabelle sind die ermittelten Meßdaten zusammengefaßt:

Tris-Konzentration	0, 012	0, 024	0, 037	0, 058	0, 070	Mol/l
Acetat-Konzentr.	0, 004	0, 008	0, 013	0, 020	0, 023	Mol/l
Elektr. Leitfähigkeit	205	387	584	1037	1282	μS
Stromstärke	32, 5	57, 4	87, 7	139, 6	155, 8	mA
Spannung	2900	2900	2900	2700	2500	V
Temperatur	8, 1	8, 1	8, 1	10, 0	11, 4	^{o}C
Viskosität	1, 38	1, 38	1, 38	1, 31	1, 25	10^{-2} poise
Ablenkung von Kat1	14, 1	11, 0	10, 2	8, 5	7, 6	cm
Ablenkung von Kat5	18, 4	14, 8	13, 4	11, 2	9, 9	cm

Das Volumen der Trennkammer wurde zu 117 ml, ihre Länge zu 43 cm, ihre Breite zu 50 cm ermittelt. Pro Stunde wurden 138 ml Puffer durch die Kammer gepumpt.

Die Teilchenradien von Kat1 und Kat5 konnten aus den durch Röntgenkleinwinkelstreuung erzielten Streumassenradien (5253) errechnet werden:

Radius a_1 von Kat1 = $\sqrt{\frac{5}{3}}$ x 40, 3 Å = 52 Å

Radius a_5 von Kat5 = $\sqrt{\frac{5}{3}}$ x 39, 2 Å = 50, 6 Å

Der Ionenradius a_i des in der Sternschicht in weitaus überwiegendem Maße enthaltenen Tris-Ions ließ sich in guter Annäherung nach

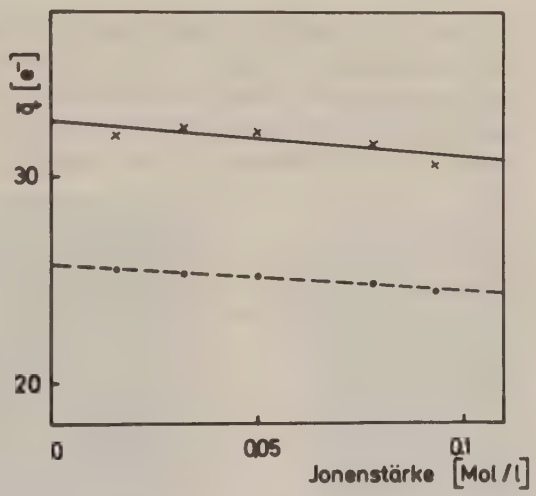
$$a_i = \sqrt[3]{\frac{3\,M}{4\,N\,\pi} \times \bar{v}} = 3, 54 \times 10^{-8} \text{ cm}$$ berechnen.

In der folgenden Tabelle sind alle zur Berechnung der Teilchenladungen nötigen Größen zusammengefaßt:

Elektr. Leitfähigkeit des Kammerpuffers	205	387	584	1037	1282	μS
Ionenstärke I (bei $z_i = 1$)	0, 016	0, 032	0, 050	0, 078	0, 093	Mol/l
Feldstärke H	0, 193	0, 181	0, 189	0, 164	0, 148	$\frac{ESU}{cm}$
Doppelschichtdicke χ	4, 26	6, 05	7, 57	9, 44	10, 3	$10^6 \times cm^{-1}$
Teilchenradius + Sternschicht von Kat1: a_1	57	57	57	57	57	Å
Teilchenradius + Sternschicht von Kat5: a_5	55, 6	55, 6	55, 6	55, 6	55, 6	Å
$1 + \chi a_i$	1, 16	1, 23	1, 29	1, 36	1, 39	
$f(\chi a)$	0, 90	0, 93	0, 97	1, 0	1, 0	
Elektrophoretische Beweglichkeit von Kat1: u_1	2, 40	1, 99	1, 84	1, 70	1, 67	$\frac{cm^2 \times 10^{-2}}{ESU \times sec}$
Elektrophoretische Beweglichkeit von Kat5: u_5	3, 12	2, 70	2, 40	2, 24	2, 18	"
$A_1 = \frac{6 \pi \eta a_1 u}{4, 803} \times 10^{10}$	7, 42	6, 15	5, 68	4, 99	4, 68	
$A_5 = \frac{6 \pi \eta a_5 u}{4, 803} \times 10^{10}$	9, 48	8, 12	7, 30	6, 47	6, 00	
$F_1 = \frac{1 + \chi (a_1 + a_i)}{f(\chi a)\ (1 + \chi a)}$	3, 44	4, 10	4, 50	4, 97	5, 22	
$F_2 = \frac{1 + \chi (a_5 + a_i)}{f(\chi a)\ (1 + \chi a)}$	3, 38	4, 02	4, 41	4, 88	5, 13	
Teilchenladung von Kat1 + Sternschicht: $\bar{q}_1 = A_1 F_1$	25, 6	25, 2	25, 2	24, 8	24, 5	Elementar-ladungen
Teilchenladung von Kat5 + Sternschicht: $\bar{q}_5 = A_5 F_5$	32, 0	32, 4	32, 2	31, 6	31, 6	"

$\bar{q}_1$ und $\bar{q}_5$ sind die durch die Gegenionen der Sternschicht verminderten Teilchennettoladungen. Die tatsächlichen Teilchennettoladungen q bei pH 8, 5 lassen sich durch graphische Extrapolation der $\bar{q}_1$- bzw. $\bar{q}_5$- Werte der verschiedenen Pufferkonzentrationen auf unendliche Pufferverdünnung finden:

Abb. 10 Graphische Extrapolation der scheinbaren Teilchennettoladungen auf unendliche Pufferverdünnung.
------- = Kat1
——— = Kat5



Wie aus der Graphik hervorgeht, beträgt die Oberflächennettoladung von Kat1 bei pH 8, 5: q_1 = 25, 8 Elementarladungen, die von Kat5: q_5 = 32, 7 Elementarladungen.

512 Elektrophoretische Eigenschaften im denaturierten Zustand

5121 Discelektrophorese in Anwesenheit von 8 M Harnstoff

Schroeder und Mitarbeiter (94) kamen 1964 aufgrund der Untersuchung tryptischer Hydrolysate von Rinderleberkatalase zu dem Ergebnis, daß

diese aus 4 identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Unter diesen Umständen sollte Rinderleberkatalase bei einer Elektrophorese in 8 M Harnstoff eine einzige Bande ergeben, denn in diesem Milieu ist das Enzym aufgefaltet (s. 523), geordnete Strukturen sind zerstört, so daß nur Größe und Ladung der Polypeptidkette über die elektrophoretische Beweglichkeit entscheiden.

Kat1 und Kat5 wurden 15 Stunden vor der Elektrophorese gegen den 8 M Harnstoff und 1 % β-Mercaptoäthanol enthaltenden Probenpuffer dialysiert, dann durch Unterschichten des Elektrodenpuffers auf das Sammelgel aufgetragen und elektrophoretisiert. Überraschenderweise zeigten die Gele nach der Elektrophorese 6 Banden und nicht wie erwartet nur 1 Bande.

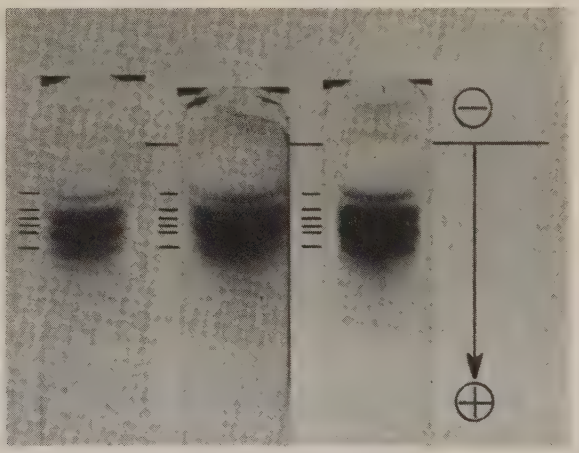


Abb. 11 Discelektrophorese in 8 M Harnstoff. V.l.n.r.: Kat1, Kat5, Kat1 + Kat2 + Kat3 + + Kat 4 + Kat5

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, liegen jeweils 2 der 4 mittleren Banden sehr dicht zusammen, können jedoch am Original eindeutig als getrennt erkannt werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, daß diese Heterogenität durch unvollständige Ablösung der prosthetischen Gruppe zustande kam, wurde diese mit Aceton-Salzsäure entfernt (56). Erst dann wurden die Proteine im Probenpuffer aufgenommen und elektrophoretisiert. Auch Rinderleberkatalasen, die nicht nur Kat1 oder Kat5, sondern auch Kat2, Kat3 und Kat4 enthielten, wurden in der gleichen Weise untersucht. Sie alle zeigten das in Abb. 11 dargestellte Bild, nämlich 6 Banden.

5122 Molekulargewichtsbestimmung der Kataleseuntereinheiten mittels SDS-Elektrophorese

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Kataleseuntereinheiten und deren Anzahl im nativen Molekül und zur Untersuchung der Frage, ob in Anwesenheit von 8 M Harnstoff und 1 % β-Mercaptoäthanol Bruchstücke der Kataleseuntereinheiten entstehen (s. 5121), wurde die SDS-Discelektrophorese nach Laemmli (38) angewendet.

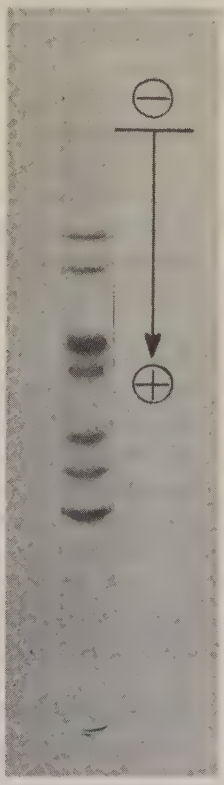


Abb. 12 Discelektrophoretische Separation der SDS-Komplexe verschiedener Enzyme bzw. ihrer Untereinheiten.
V.o.n. u.:
β-Galaktosidase, Phosphorylase a, Rinderserumalbumin, Katalase, Fumarase, Alkoholdehydrogenase (Pferdeleber), Lactatdehydrogenase (Rinderherz).

Als Vergleichsproteine kamen folgende zur Anwendung:

Protein	Molekulargewicht der Untereinheit	Literatur
β- Galaktosidase	130.000	(96)
Phosphorylase a	94.000	(96, 97)
Rinderserumalbumin	68.000	(98)
Pyruvatkinase	57.000	(99)
Fumarase	49.000	(100)
Alkoholdehydrogenase (Pferdeleber)	41.000	(101, 102)
Aldolase	40.000	(101, 103, 104)
Lactatdehydrogenase (Rinderherz)	36.000	(101)

Glossmann und Bode (95) fanden durch statistische Auswertung, daß im Vergleich zu getrennten Läufen von zu messenden und von Referenzproteinen sehr viel zuverlässigere Werte erhalten wurden, wenn das zu bestimmende Protein mit den Referenzsubstanzen in einem Gel lief.

Wie Abb. 12 zeigt, war dies unter den gewählten Bedingungen ohne weiteres möglich, da die Trennung der verschiedenen Proteine so deutlich und die Banden so scharf waren, daß die einzelnen Wanderungsstrecken einwandfrei meßbar waren. Lactatdehydrogenase, mit dem unter den verwendeten Proteinen kleinsten Molekulargewicht, wurde zur Standardisierung der Gele grundsätzlich immer aufgetragen. Durch Division der gemessenen Wanderungsstrecken durch die Wanderungsstrecke von LDH erhielt man relative Beweglichkeiten, welche dadurch automatisch auf Änderungen in den Geldimensionen korrigiert waren (LDH hatte dann entsprechend die relative Beweglichkeit 1, bei allen anderen Proteinen lag diese unter 1).

Kat1 und Kat5 und käufliche Katalase wurden wie die Referenzproteine im Probenpuffer gelöst und inkubiert. Sie alle liefen als einheitliche schmale Bande, was besonders dann eindeutig zu sehen war, wenn sie ausnahmsweise einzeln, also ohne Vergleichsproteine elektrophoretisiert wurden.

Zur Ermittlung des Molekulargewichtes der Katalaseuntereinheiten wurden die Logarithmen der Molekulargewichte der Referenzsubstanzen über den relativen Beweglichkeiten aufgetragen.

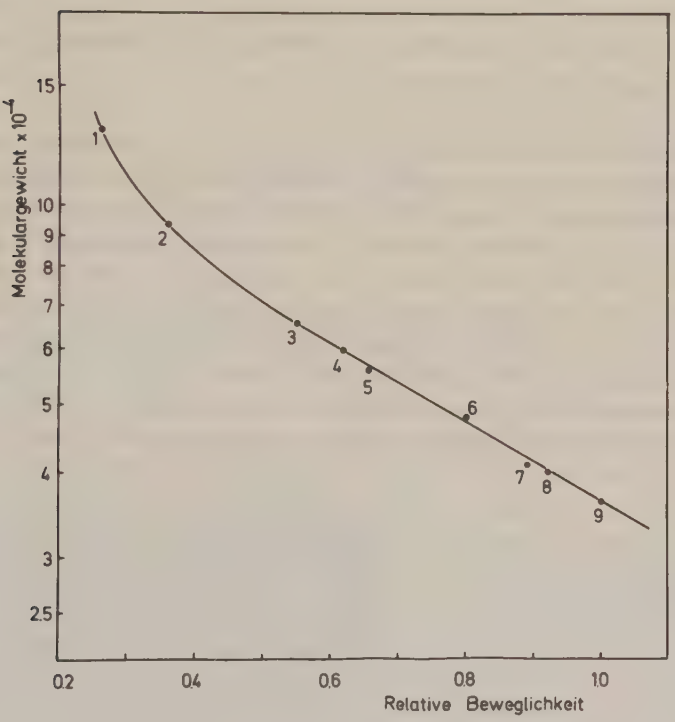


Abb. 13 Halblogarithmische Auftragung der Molekulargewichte von Eichsubstanzen gegen die relative Beweglichkeit ihrer SDS-Komplexe zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Katalaseuntereinheiten.
1 = β-Galaktosidase, 2 = Phosphorylase a, 3 = Rinderserumalbumin,
4 = Katalase, 5 = Pyruvatkinase, 6 = Fumarase, 7 = ADH,
8 = Aldolase, 9 = LDH.

Wie Abb. 13 zeigt, ergab sich bis zu einem Molekulargewicht von ca. 75.000 eine lineare Abhängigkeit. Erst bei höheren Molekulargewich-

ten folgten die Wanderungsstrecken der Proteine nicht mehr dem logarithmischen Gesetz. Die ermittelte relative Beweglichkeit von Rinderleberkatalase (bzw. ihrer Untereinheiten) lag auf dem linearen Teil der Kurve, so daß das daraus resultierende Molekulargewicht von 60.000 als zuverlässig bezeichnet werden kann.

5123 SDS-induzierte Spaltung von Katalase in Abwesenheit eines Reduktionsmittels

Zum Nachweis des Fehlens von Disulfidbrücken zwischen den 4 Untereinheiten von Rinderleberkatalase (s. Heidrich (33)) und zur Überprüfung der Ergebnisse, die Sund (105) bei Sedimentations- und Diffusionsstudien an SDS-behandelter Katalase in Abwesenheit reduzierender Agentien erzielte (u. a. Auftreten eines Dissoziationsproduktes mit dem Molekulargewicht 80.000) wurde sowohl Kat1 als auch Kat5 im Inkubationspuffer (0,1 % SDS, 0,01 M Na-Phosphat pH 7,0), der kein Reduktionsmittel enthielt, eine halbe, eine und zwei Stunden bei 37,5°C gehalten. Nach Ablauf dieser Fristen wurden die Proben zur Erhöhung der Dichte mit etwas Saccharose versetzt und sofort der Elektrophorese unterworfen.

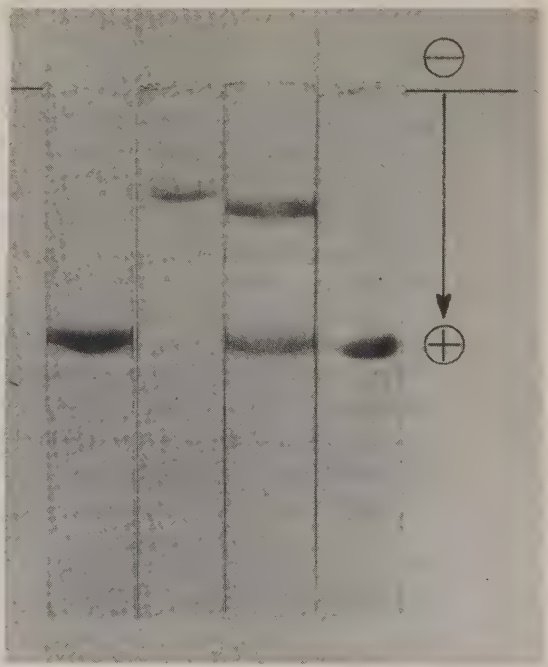


Abb. 14 SDS-Elektrophorese in Abwesenheit von β-Mercaptoäthanol in 7,5 %igen Gelen.
V.l.n.r.:
Rinderleberkatalase, β-Galactosidase, beide gelöst in 8 M Harnstoff, 1 % β-Mercaptoäthanol, 1 % SDS;
Katalase nach halbstündiger Inkubation in 0,1 % SDS;
Katalase nach zweistündiger Inkubation in 0,1 % SDS.

Abb. 14 zeigt das elektrophoretische Verhalten von Katalase nach halbstündiger bzw. zweistündiger Inkubation bei 37,5 °C. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der entstandenen Dissoziationsprodukte wurden die Untereinheiten von Katalase (Molekulargewicht 60.000) und β-Galaktosidase (Molekulargewicht 130.000), beide gelöst in 8 M Harnstoff, 1 % SDS, 1 % β-Mercaptoäthanol, 0,01 M Na-Phosphat pH 7,0, herangezogen. Während Kat1 und Kat5 nach halbstündiger Inkubation in 0,1 % SDS noch zwei Banden, die dem Molekulargewicht 60.000 bzw. 120.000 entsprachen, aufwiesen, erschien nach zweistündiger Inkubation nur noch eine Bande, welche die Beweglichkeit eines Proteins mit dem Molekulargewicht 60.000 besaß. Diese Verhalten zeigten beide Katalasespezies in völlig identischer Weise. Der Versuch ergab also eindeutig, daß keine S-S-Brücken zwischen den Untereinheiten von Kat1 bzw. Kat5 vorhanden sind.

513 Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten durch Gelfiltration

Käufliche Rinderleberkatalase, Kat1 und Kat5 wurden durch 15-stündige Dialyse gegen den Harnstoff und β-Mercaptoäthanol enthaltenden Probenpuffer unter Öffnung der Disulfidbrücken aufgefaltet, so daß die Polypeptid-Ketten mit Ausnahme der Primärstruktur keine geordneten Strukturen mehr aufwiesen, sondern nur noch als statistische Knäuel vorlagen. In der gleichen Weise wurde mit den Vergleichsproteinen verfahren. Unter diesen Umständen wurde das zur Elution der einzelnen Proteine nötige Puffervolumen bei gegebenen Säulendimensionen nur durch die Länge der Polypeptid-Ketten und damit in sehr guter Näherung aufgrund ihres Molekulargewichtes bestimmt. Durch Erstellung einer Eichkurve anhand bekannter Proteine konnte also das Molekulargewicht eines unbekannten Eiweißes (bzw. falls vorhanden seiner Untereinheiten) aus dem Elutionsvolumen bestimmt werden. Zur Verbesserung der Methode wurden allerdings nicht die reinen Elutionsvolumina V_e, sondern die Quotienten aus den Elutionsvolumina und demmittels Blue Dextran 2000 (Molekulargewicht 2.000.000) erhaltenen Ausschlußvolumen V_o bestimmt (s. 3229).

In der folgenden Graphik wurden die Logarithmen der Molekulargewichte über den Quotienten aus V_e und V_o aufgetragen. Im Molekulargewichtsbereich von 30.000 bis 90.000 zeigte sich eine völlig lineare Abhängigkeit der obenerwähnten Parameter. Erst bei höheren Molekulargewichten (Annäherung an das Ausschlußvolumen) wich die Kurve zunehmend stärker ab. Der Quotient V_e/V_o der untersuchten Katalasen lag jedoch mit einem Wert von 1,57

auf dem linearen Abschnitt, d. h. das resultierende Molekulargewicht von 60.000 kann - im Bereich der Fehlergrenze der Methode - als genau und richtig erachtet werden. Es ist in ausgezeichneter Übereinstimmung mit dem bei der SDS-Elektrophorese (nach Laemmli) erhaltenen Wert.

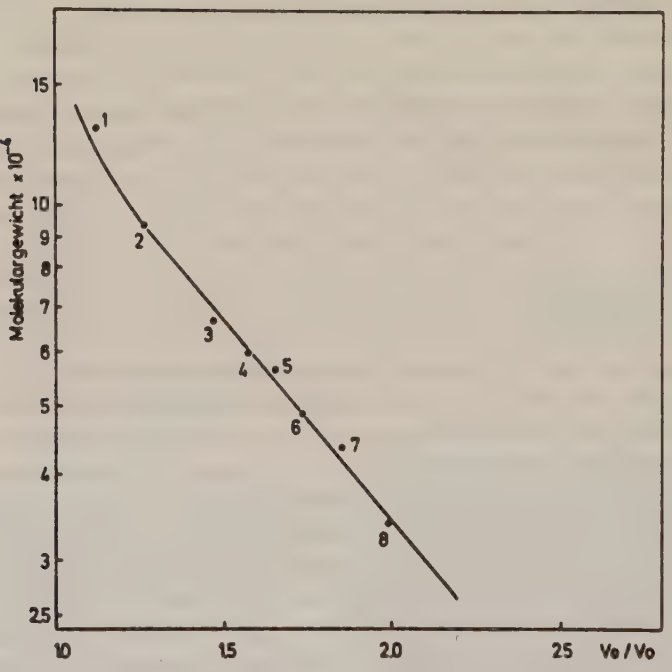


Abb.15 Gelfiltration (Sephadex G 200) in Anwesenheit von 8 M Harnstoff und 0,1 % β -Mercaptoäthanol. Zur Erstellung einer Eichkurve sind die Logarithmen der Molekulargewichte bekannter Proteine gegen V_e/V_o aufgetragen.

514 Auftrennung der tryptischen Peptide von Kat1 und Kat5

Zum Vergleich der Primärstruktur von Kat1 und Kat5 wurden deren tryptische Peptide untersucht. ("fingerprint" auf der Säule).

Beide Katalasespezies wurden nach Hitzedenaturierung mit TPCK-Trypsin gespalten. Die erhaltenen Peptide wurden mittels eines Kationenaustauschers (0,1 x 50 cm Aminex A 6) aufgetrennt. Trotz des sehr guten Auflösungsvermögens der Säule konnten keine signifikanten Unterschiede in den Peptidmustern von Kat1 und Kat5 entdeckt werden.

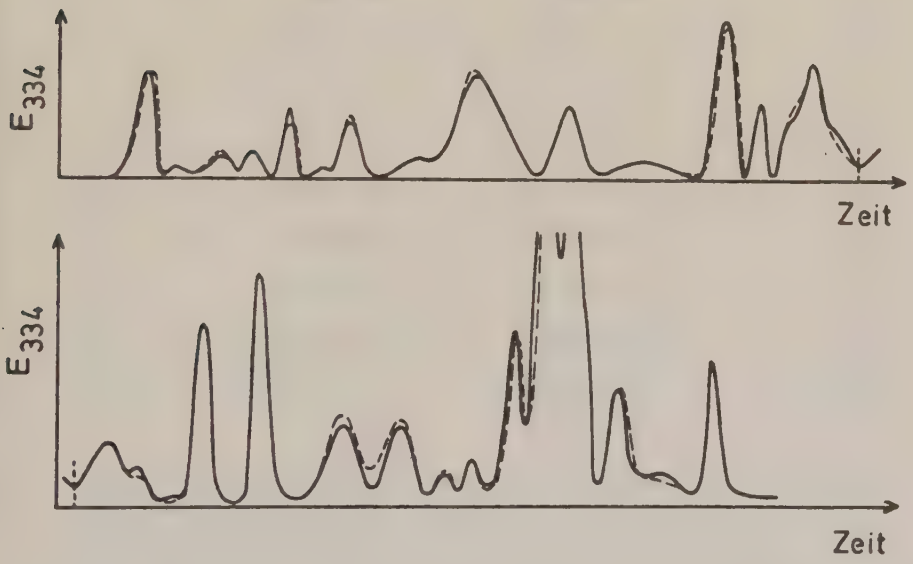


Abb. 16 Chromatogramm der tryptischen Peptide von Kat1 (----) und Kat5 (——). Die untere Kurve stellt die Forsetzung der oberen Kurve dar.

515 Aminosäureanalyse

Sowohl von Kat1 als auch von Kat5 wurden mehrere Analysen durchgeführt. Die Mittelwerte der dabei erzielten Ergebnisse sind in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt. Die Angaben beziehen sich auf ein Molekulargewicht von 240.000 für beide Enzyme.

Aminosäure	Aminosäurereste/Molekül Kat1	Kat5
Asp	281 (280, 7)	279 (279, 4)
Thre	89 (88, 7)	88 (88, 0)
Ser	75 (75, 4)	77 (76, 9)
Glu	195 (194, 5)	197 (196, 7)
Pro	155 (155, 3)	151 (150, 7)
Gly	149 (149, 4)	148 (148, 1)
Ala	129 (129, 4)	132 (132, 1)
Val	125 (124, 6)	127 (126, 6)
1/2 Cys	21 (21, 3)	21 (21, 0)
Ileu	70 (69, 8)	72 (72, 4)
Leu	141 (140, 7)	143 (142, 9)
Tyr	75 (74, 5)	75 (74, 8)
Phe	119 (118, 9)	119 (118, 6)
Try	37 (37, 0)	37 (37, 2)
His	77 (77, 0)	78 (78, 3)
Lys	104 (104, 3)	105 (104, 7)
Arg	111 (110, 6)	110 (109, 6)

Wenn auch bei den verschiedenen Analysenläufen das Verhältnis der einzelnen Aminosäuren leicht variierte, so ergaben sich doch kaum größere Abweichungen. Die Übereinstimmung der einzelnen Werte kann in Anbetracht des hohen Molekulargewichts der untersuchten Proteine als recht gut bezeichnet werden.

Die Analyse des Tryptophangehaltes geschah nach Edelhoch (61) mittels der von 6 M Gu·HCl-Katalaselösungen (pH 6, 5) ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten bei 288 und 280 nm. Nach Edelhoch bestehen bei diesen Wellenlängen die geringsten Extinktionsunterschiede zwischen den unter diesen Bedingungen völlig aufgefalteten Proteinen und äquimolaren

Modellpeptiden (z. B. N-acetyl-L-tryptophanamid). Mittels der an den Katalaselösungen gemessenen Extinktionskoeffizienten (s. Abb. 17) konnte für Kat1 und Kat5 ein identischer Tryptophangehalt von 37, 0 Resten pro Molekül errechnet werden (bezogen auf ein Molekulargewicht von 240. 000).

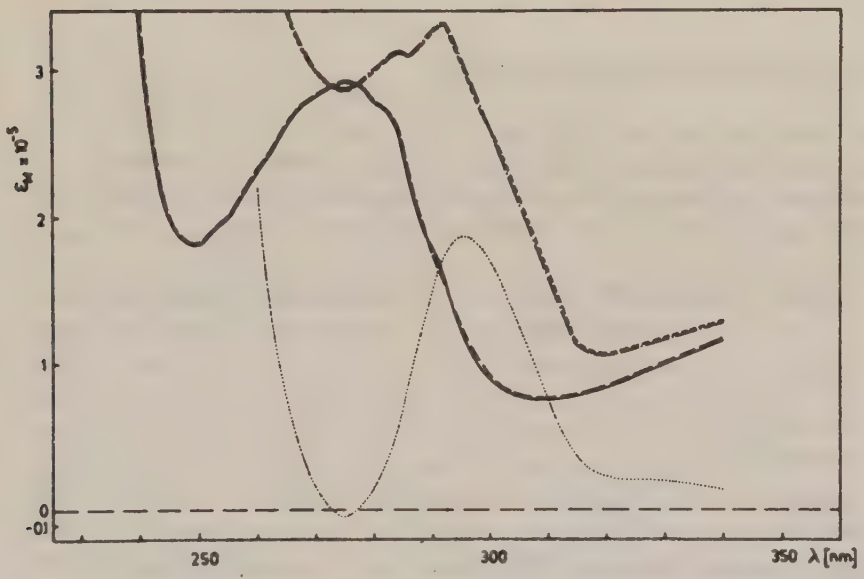


Abb. 17 Absorbtionsspektren im nahen UV von Kat1 (– – – –) bzw. Kat5 (————) in 6 M Gu·HCl bei pH 6, 5 und von Kat1 (–·–·–) bzw. Kat5 (------) in 6 M Gu·HCl bei pH 12, 5. Die punktierte Linie stellt das aus der pH-Verschiebung resultierende Differenzspektrum dar.

Da Rinderleberkatalase Tryptophan enthält, wurde die Tyrosinbestimmung nicht aus den Absorbtionsspektren der 6 M Gu·HCl - Katalaselösungen bei pH 6, 5 durchgeführt, sondern mit größerer Genauigkeit aus der Extinktionszunahme bei Umstellung des pH-Wertes dieser Lösungen von 6, 5 nach 12, 5. Die aus den resultierenden Differenzspektren entnommenen Extinktionsänderungen bei 295 und 300 nm ergaben in Verbindung mit den von Edelhoch angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten (2480 bei 295 nm bzw. 2270 bei 300 nm) für Kat1 und Kat5 75 Mole Tyrosin pro Mol Enzym (bei einem

Molekulargewicht von 240.000). Dies wird auch noch durch die Extinktionszunahme der beiden Katalasespezies in 0,2 M NaCl-Lösung bei Umstellung des pH-Wertes von 7,5 auf 12,5 bestätigt (s. Abb. 22). Von Stapraus et al. (106) wird unter diesen Bedingungen für 295 nm ein molarer Extinktionskoeffizient von 2.400 angegeben. Entsprechend ihren experimentellen molaren Extinktionskoeffizienten von 18,5 x 10^4 enthält jedes Mol Kat1 bzw. Kat5 77 Mole Tyrosin.

516 Bestimmung von Sulfhydrylgruppen

Mittels einer Analyse der Thiolgruppen von Kat1 und Kat5 wurde versucht, diese sowohl im nativen Molekül als auch im denaturierten, aufgefalteten Zustand zu lokalisieren und aus sich möglicherweise zeigenden Unterschieden Hinweise zur Struktur der untersuchten Proteine zu gewinnen.

Protein	Zahl der SH-Gruppen im nativen Zustand	Zahl der SH-Gruppen im denaturierten Zustand
Kat1	0,9	6,9
Kat1 (DTT-behandelt)	0,9	7,0
Kat5	0,9	10,9

Tab. 2 Ergebnis der Thiolgruppenanalyse von Kat1, Kat5 und Kat1 (DTT-behandelt).

Tab. 2 zeigt, daß die durch DTNB erfaßbare Zahl von SH-Gruppen bei den nativen Enzymen gleich, nämlich 0,9 pro Molekül, war. Ein signifikanter Unterschied trat jedoch auf, wenn die übergeordneten Strukturen der Polypeptidketten durch Behandlung mit Gu·HCl zusammenbrachen. In diesem Fall wurden auch die sogenannten verborgenen Sulfhydrylgruppen zugänglich. Dies zeigte sich schon an der um ein Vielfaches erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit der SH-Gruppen bei den denaturierten Proteinen gegenüber der SH-Gruppe der nativen Moleküle. Aber nicht nur eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch des Sulfhydrylgehaltes war feststellbar. Im Gegensatz zu den "freien" SH-Gruppen, welche bei beiden Katalasespezies in gleicher Anzahl vorhanden waren, zeigte sich ein Unterschied bei den "verborgenen" Thiolgruppen. Während Kat1 nur

6, 9 (7, 0) SH-Gruppen hatte, waren 10, 9 bei Kat5 nachweisbar, also zusätzliche 4. Die mit DTT behandelte Kat1 wies den gleichen Sulfhydrylgehalt auf wie normale, d. h. durch bloße Ionenaustauschchromatographie dargestellte Kat1.

517 Analyse primärer Aminogruppen

Um Information über die Oberflächenbeschaffenheit von Kat1 bzw. Kat5 durch Erfassung definierter Gruppen zu gewinnen, wurde neben der Analyse der Thiolgruppen (s. 516) und der Tyrosine (s. 522) auch eine Bestimmung der an der Oberfläche befindlichen freien Aminogruppen mit 2, 4, 6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) vorgenommen. Da die Reaktion in Form einer nukleophilen aromatischen Substitution ablief, reagierten neben den freien Aminogruppen auch die durch hohe nukleophile Kraft ausgezeichneten Mercaptidanionen der Cysteine. Ihr Gehalt war jedoch bekannt (s. 516) und desgleichen der molare Extinktionskoeffizient der trinitrophenylierten SH-Gruppe, der von Fields (57) mit 2250 angegeben wird. Mit diesen Werten konnte das durch die Thiolgruppen verfälschte Ergebnis korrigiert werden. Es zeigte sich, daß dem Reagens bei Kat1 42, 6 Aminogruppen pro Molekül zugänglich waren, während es bei Kat5 nur 38, 2, also 4, 4 weniger, erfassen konnte.

518 Hybridisierung

Abb. 18 zeigt das Ergebnis des Versuchs Kat1 und Kat5 in Gegenwart von 1 M NaCl durch Einfrieren und Auftauen bzw. durch bloßes Belassen bei Zimmertemperatur zu hybridisieren. Während die reinen Lösungen von Kat1 bzw. Kat5 unverändert blieben, zeigte das Gemisch der beiden Katalasespezies nach der Behandlung 5 Banden in der Discelektrophorese. Erstaunlicherweise ließ sich dieser Effekt durch einfache Einwirkung von 1 M NaCl

bei Zimmertemperatur genauso erzielen wie durch Kälte-Wärme-Behandlung.

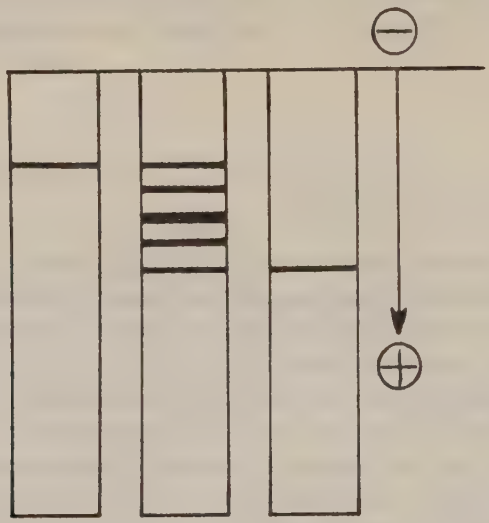


Abb. 18 Discelektrophoretische Untersuchung der Hybridisierungsversuche. (7,5 %iges Tris-Borsäure-Gel)
V.l.n.r.:
Kat1; Kat1 + Kat5; Kat5 jeweils nach Kälte-Wärme-Behandlung bzw. nach 15 Stunden bei Zimmertemperatur in Anwesenheit von 1 M NaCl.

519 Kohlehydratanalyse

Abb. 19 zeigt das gaschromatographische Elutionsdiagramm einer Mischung verschiedener silylierter Kohlehydrate. Die Nachweisgrenze der angewendeten Methode lag in Abhängigkeit vom individuellen Kohlehydrat bei 0,02 bis

0,05 µMol. Selbst bei dieser hohen Empfindlichkeit konnte in Rinderleberkatalase keiner der im Testgemisch verwendeten Zucker nachgewiesen werden. Es zeigten sich zwar Banden im fraglichen Bereich, ihre R_f-Werte waren jedoch keinem Kohlehydrat zuzuordnen. Es handelte sich dabei offenbar um Aminosäurederivate.

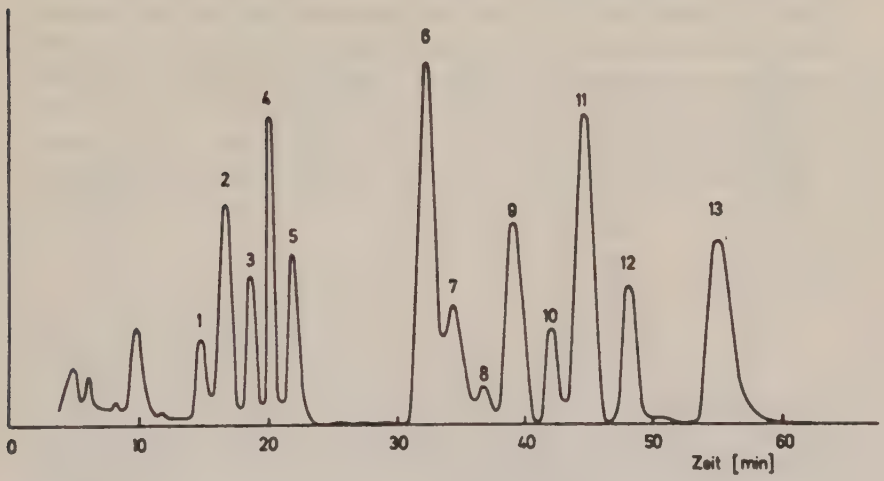


Abb. 19 Gaschromatographische Auftrennung eines Gemisches silylierter Monosaccharide. 1, 2, 3 = Fucose; 4, 5 = Xylose; 6, 8 = Mannose; 7, 9, 10 = Galactose; 11, 12 = Glucose; 13 = Mannit (= interner Standard)

52 Biophysikalische Charakterisierung von Kat1 und Kat5

521 Absorptionsspektren

Es wurden die Spektren von Kat1 und Kat5 bei pH 8, 0 (0, 01 M Na-Phosphat, 0, 2 M NaCl) im Wellenlängenbereich von 210 nm bis 700 nm aufgenommen.

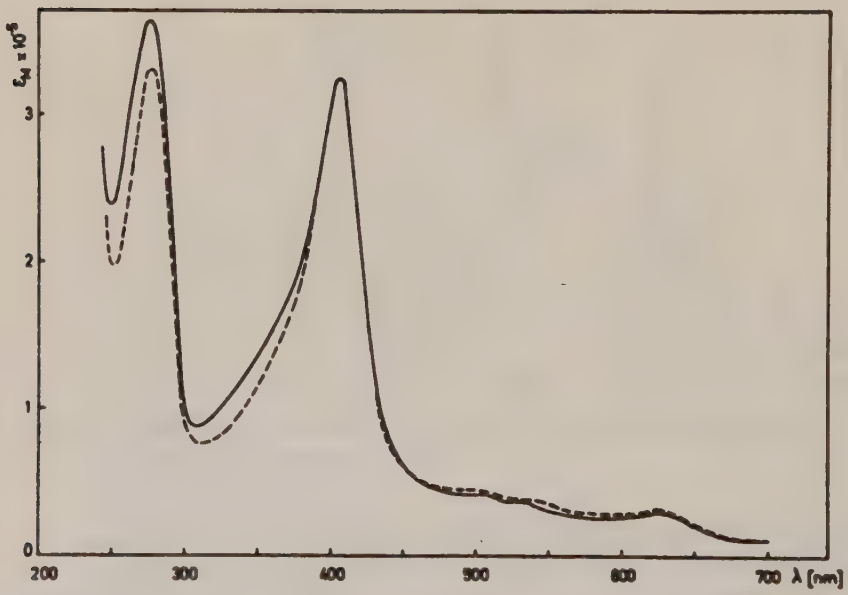


Abb.20 Absorptionsspektren von Kat1 (- - - -) und Kat5 (————) bei pH 8, 0 (0, 01 M Na-Phosphat, 0, 2 M NaCl).

Um einen unabhängigen, d. h. nicht auf spektroskopischen Grundlagen beruhenden Konzentrationsvergleich der beiden Katalasespezies zu haben, wurde eine Stickstoffbestimmung durchgeführt (s. 3221). Die dabei erhaltenen Werte (pro Spezies 6Ø) wichen untereinander nur sehr gering ab ($\pm$ 3 %), so daß die gebildeten Mittelwerte einen genauen Konzentrations-

vergleich zuließen.

In Abb. 20 sind die molaren Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgezeichnet. Dabei wurde ein Molekulargewicht von 240.000 zugrunde gelegt, da dieses auch durch die SDS-Elektrophoreseversuche (s. 5122) und die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration (s. 513) bestätigt werden konnte. Das Spektrum zeigte zwei starke Banden, nämlich bei 405 nm und 280 nm. Auffällig ist dabei die Intensitätszunahme der Absorptionskurve von Kat5 gegenüber der von Kat1 im nahen UV-Bereich. Eine andere, besonders für spektroskopische Konzentrationsbestimmungen wichtige Tatsache ist die völlig identische Höhe der Banden bei 405 nm von Kat1 und Kat5. Dies bedeutet, daß der in der Literatur von Samejima und Yang (49) angegebene molare Extinktionskoeffizient bei 405 nm von $3,24 \times 10^5$ sowohl für Kat1 als auch für Kat5 zutrifft.

522 Tyrosin-Titration

Mittels der spektrophotometrischen Titration, d. h. der spektroskopischen Verfolgung der Tyrosinionisierung mit steigendem pH, wurde versucht, die Tyrosine von Kat1 und Kat5 zu lokalisieren und aus einem eventuell unterschiedlichen Titrationsverhalten Auskunft über Bindungsverhältnisse und Stabilität zu erlangen.

In Abb. 21 sind die Änderungen der molaren Extinktionskoeffizienten neutraler (0,2 M NaCl, pH 7,5) Kat1 und Kat5-Lösungen bei Alkalisierung wiedergegeben. In der gleichen Graphik ist auch die Ionisationstitrationskurve von Tyrosin aufgetragen. Von deren sigmoidem Verlauf mit Wende- oder Mittelpunkt um pH 10 unterscheiden sich deutlich die Titrationskurven der untersuchten Katalasen, welche um ca. eine pH-Einheit ins Alkalische verschoben sind.

Betrachtet man zunächst die beiden Kurven, die sich aus der Messung unmittelbar nach Alkalizugabe ergaben, zu fällt eine Schulter um pH 10 in der Titrationskurve von Kat1 auf, was eine erhöhte Anzahl von "freien" Tyrosinen an der Oberfläche von Kat1 gegenüber Kat5 bedeutet. Mit dieser Schulter ist auch ein Extinktionsunterschied im Vergleich zu Kat5 vor-

handen. Entsprechend der geringen Extinktionszunahme von $1,9 \times 10^4$ bei pH 10 scheinen nur 16 der 75 Tyrosine von Kat1 ein Titrationsverhalten wie "freies" Tyrosin besessen zu haben. Noch geringer, nämlich nur 10, war die Anzahl der "freien" Tyrosine von Kat5 ($\Delta \varepsilon = 1,2 \times 10^4$). Erst ab pH-Werten von 10, 6, bei denen die Auffaltung der Proteine begann, stiegen die Extinktionen bei 295 nm steil an.

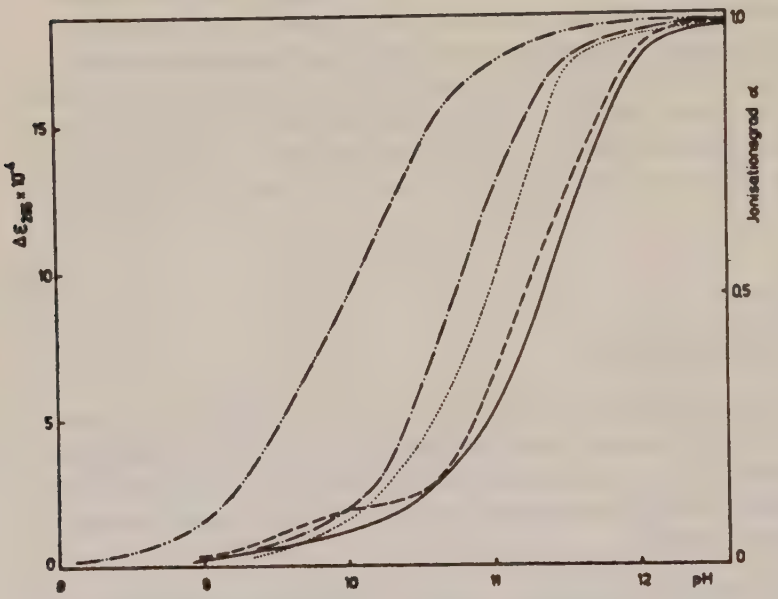


Abb.21 Titration der Tyrosine von Kat1 und Kat5: Extinktionsänderungen bei 295 nm unmittelbar nach Alkalisierung von Kat1 (----) bzw. Kat5 (———) und 10 min nach Alkalizugabe zu Kat1 (—·—·—·) bzw. Kat5 (·····). Außerdem ist die Änderung des Ionisationsgrades α von Tyrosin aufgetragen (·—··—).

Dieser Anstieg vollzog sich bei den Meßkurven, die erst 10 min nach Alkalizugabe aufgenommen wurden, bereits ab pH 10, 2, da die Proteine während der zehnminütigen Inkubationszeit erwartungsgemäß stärker auffalteten, als dies unmittelbar nach Alkalisierung geschah. Die beiden Titrationskurven von Kat5 waren jedoch stärker ins Alkalische verschoben

als die von Kat1.

523 ORD- und CD-Spektren

Die Optische Rotationsdispersion und der Circulardichroismus eignen sich u. a. sehr gut für die Untersuchung der Strukturen (besonders der α-helikalen Anteile), in denen die Polypeptidketten von Proteinen vorliegen, bzw. um Änderungen dieser Strukturen zu erkennen.

Abb. 22 zeigt die ORD-Spektren von Kat1 und Kat5 bei pH 7, 9 (0, 05 M Tris-HCl, 0, 1 M NaCl, 0, 01 % Thymol) bzw. in 6 M Gu·HCl, 0, 05 M Tris-HCl, 0, 1 M NaCl pH 7, 9 und in 8 M Harnstoff, 0, 05 M Tris-HCl, 0, 1 M NaCl pH 7, 9. Aufgetragen wurde jeweils die spezifische Drehung $[\alpha]$ gegen die Wellenlänge λ. Beide Katalasespezies zeigten sowohl in 6 M Gu·HCl als auch in 8 M Harnstoff das typische Spektrum ungeordneter Proteine (⸺). Bei 233 nm lag die spezifische Drehung mit einem Wert von $-1,9 \cdot 10^3$ etwas unterhalb einiger u. a. von Tanford an Proteinen gemessener Werte.

Die ORD- und CD-Kurven der nativen Katalasen (= = =) wiesen dagegen auf einen deutlichen Anteil an α-helikaler Struktur hin. Kat1 und Kat5 zeigten weder im ORD- noch im CD-Spektrum signifi-

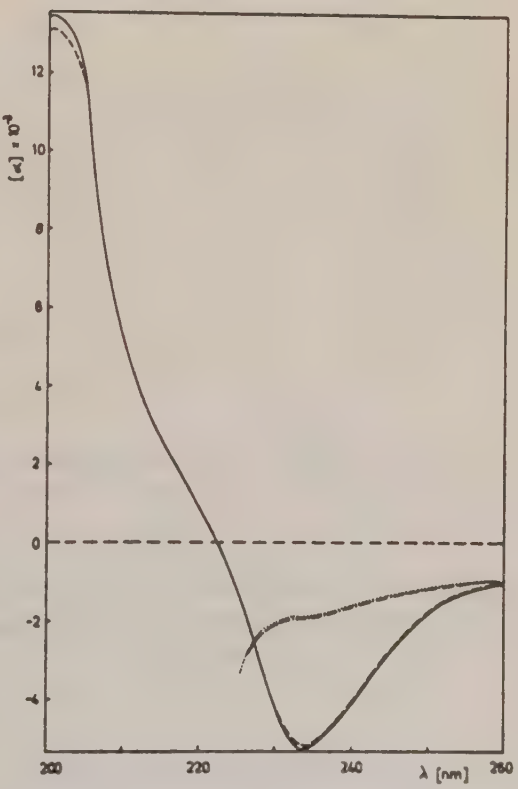


Abb. 22 ORD-Spektren von Kat1 und Kat5 in verschiedenen Lösungsmitteln (s. Text).

kante, als Strukturumwandlung deutbare Unterschiede. Bemerkenswert ist dagegen der Wert von $[\alpha]$ bei 233 bzw. 200 nm im ORD-Spektrum, welcher sich auf $-5,3 \times 10^3$ bzw. $13,3 \times 10^3$ belief, während Samejima et al. (107) von einer spezifischen Drehung von -8×10^3 bzw. 33×10^3 berichteten. Zur Überprüfung dieses eklatanten Unterschiedes, welcher bei allen untersuchten Katalasepräparaten (auch käuflichen Katalasen) in gleicher Höhe vorhanden war, wurde eine nach der von Samejima angegebenen Methode (s. 311) hergestellte Katalase gemessen. Der Verlauf der in dieser Messung erhaltenen Kurve war völlig identisch mit den in Abb. 22 dargestellten Kurven.

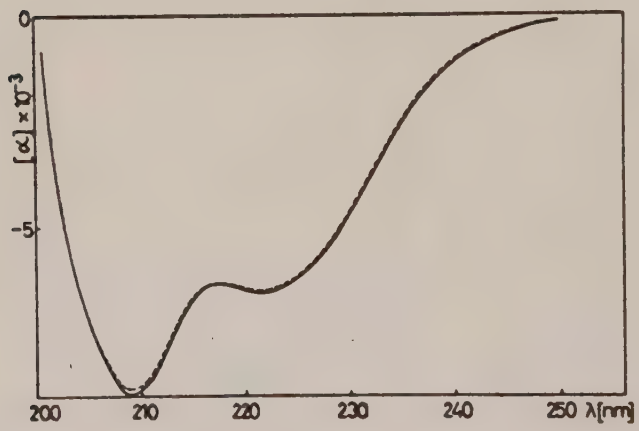


Abb.23 CD-Spektren von Kat1 (– – –) und Kat5 (——) bei pH 7,9 (0,05 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,01 % Thymol).

524 Abschätzung des α-Helixgehaltes

Wie bei 412 beschrieben, kann der α-Helixgehalt eines Proteins sowohl aus dessen ORD- als auch aus seinem CD-Spektrum berechnet werden. Da sich diese Berechnungen größtenteils auf experimentell ermittelte Werte stützen, die man an vergleichsweise einfach gebauten Modellsubstanzen

gemessen hat, entbehren sie allzu großer Genauigkeit und sind daher eher als mit mehr oder weniger großen Fehlern behaftete Abschätzungen zu betrachten.

Art des Spektrums	λ	[R]	[θ]	Gleichung	Helix-Gehalt
ORD	233	-4560		30	25 %
CD	222		-7340	31	27 %
CD	210		-10000	32	22 %
CD	223		-7270	33	24 %

Die in dieser Tabelle angegebenen α-Helixberechnungen gelten für Kat1, Kat5 und die nach Shirakawa selbst hergestellte Katalase, da sich die aus den angegebenen Spektren entnommenen Werte für die einzelnen Katalasen bei den jeweiligen Wellenlängen praktisch nicht unterschieden.

525 Röntgenkleinwinkelmessungen

5251 Vorbereitung der Meßlösungen

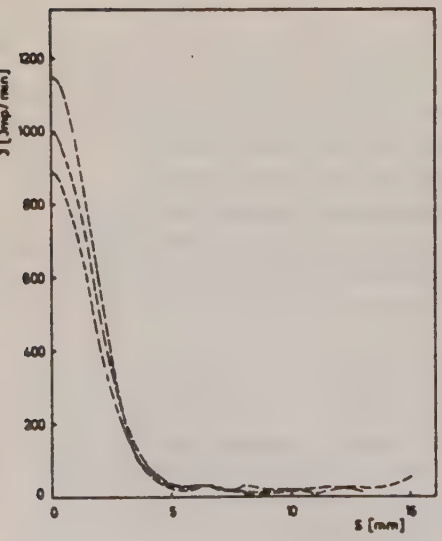
Kat1 und Kat5 wurden mindestens 12 Stunden gegen Tris-Puffer von pH 8,5 (0,05 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 0,1 % Thymol) dialysiert. Falls eine Konzentrierung der Proteinlösungen nötig war, geschah dies durch Ultrafiltration (Amicon Diaflo). Unmittelbar vor Beginn der Messungen wurden die Proben bei 48000 g ca. eine halbe Stunde zentrifugiert, um sie von eventuellen Verunreinigungen zu befreien. Anschließend konnte die Katalasekonzentration spektrophotometrisch bei 405 nm ermittelt werden. Vor bzw. während jeder Messung wurden die Proben discelektrophoretisch auf Reinheit bzw. Veränderungen geprüft.

Zur Kontrolle der ganzen Meßanordnung und der Meßergebnisse sowie zur Volumensbestimmung wurden wiederholt zwischen den Messungen an Katalase auch solche an Humanhämoglobin durchgeführt, da dies sowohl aus Röntgenkleinwinkelstreumessungen (108, 109) als auch durch Röntgenkristallstrukturanalyse (110, 111, 112) sehr gut bekannt ist.

5252 Direkt gemessene Streukurven

Um die Partikelstreukurven, d.h. diejenigen Kurven, die nur durch Streuung der Proteinmoleküle zustande kamen, zu erhalten, wurden die Streuwerte von Küvette u. Lösungsmittel von denen der Proteinlösungen subtrahiert, die resultierenden Streukurven auf 1 %ige Lösungen umgerechnet und auf unendliche Verdünnung extrapoliert.

In Abb. 24, 25 sind die direkt gemessenen Streukurven von Kat1 u. Kat5 aufgetragen. Die Intensitäten entsprechen den jeweiligen Konzentrationen der Proteinlösungen bei 15 min Meßzeit pro Meßpunkt (jedoch auf Impulse pro min umgerechnet). Bei sehr kleinen Winkeln lagen die Streuintensi-



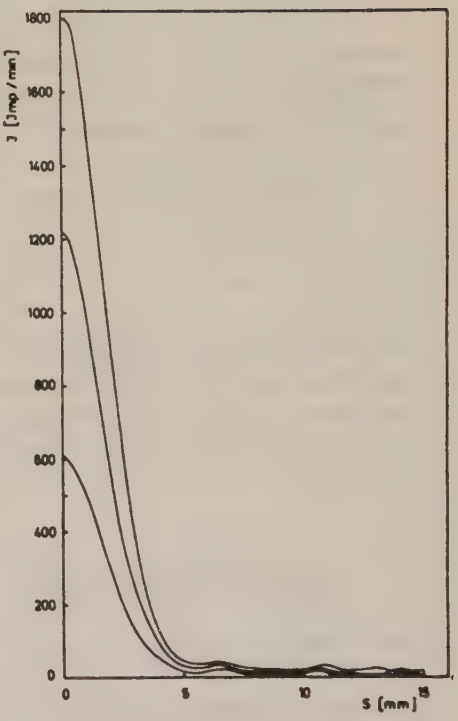


Abb. 24 Direkt gemessene Streukurven von Kat5 bei verschiedenen Konzentrationen (1, 37 %; 0, 92 %; 0, 47 %).

Abb. 25 Direkt gemessene Streukurven von Kat1 bei verschiedenen Konzentrationen (0, 81 %; 0, 65 %; 0, 58 %).

täten der konzentrierteren Lösungen relativ gesehen etwas unter denen der auf 1 % Protein bezogenen und auf unendliche Verdünnung extrapolierten Lösungen. Dies war auf Interpartikeleffekte zurückzuführen. Außerdem zeigen die Graphiken, daß Kat5 zwei Nebenmaxima erzeugte, nämlich bei s= 6,4 mm bzw. bei s=10,8 mm. Dagegen hat Kat1 nur ein ausgeprägtes Nebenmaximum bei s=6,4 mm.

In Abb.26,27 sind die inneren Bereiche der nicht entschmierten Partikelstreukurven von Kat1 bzw. Kat5 halblogarithmisch gegen das Quadrat des Abstandes zwischen Meßpunkt und Primärstrahlschwerpunkt aufgetragen (sog. Guinierauftragung). Beide Spezies zeigen das Streuverhalten isotroper Körper und folgen daher in Relation zu ihrer Größe bis zu vergleichsweise großen Winkeln der Guinierschen Näherung. Die Streukurven assymmetrischer, monodispers gelöster Körper in Guinierauftragung haben dagegen im innersten Bereich einen steilen linearen Abfall, nach welchem die Kurve in einen flacheren Verlauf einbiegt.

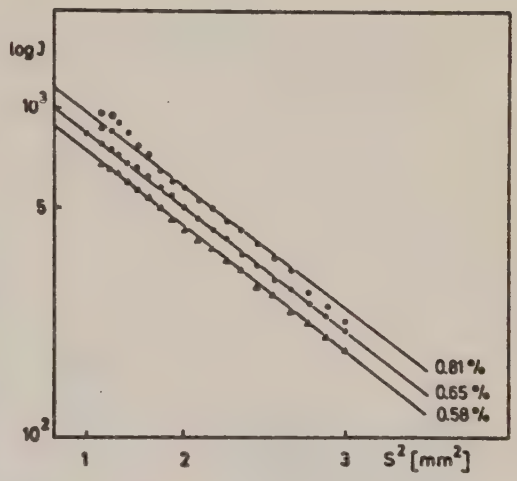


Abb.26 Streukurven von Kat1 in Guinierauftragung (verschmiert).

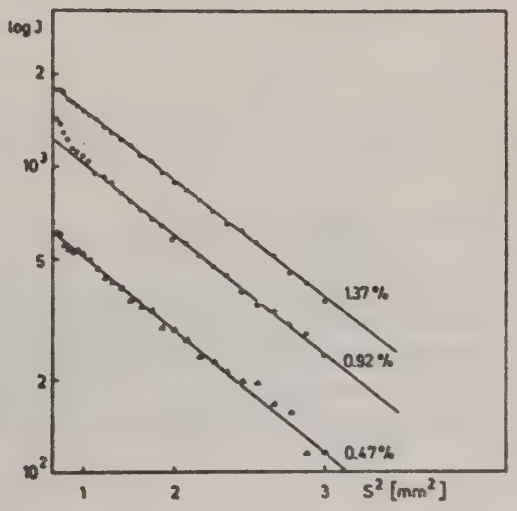


Abb. 27 Streukurven von Kat5 in Guinierauftragung (verschmiert).

Zur Eliminierung von Interpartikeleffekten wurden die ursprünglich gemessenen Kurven auf Konzentration 1 normiert, sodann auf unendliche Verdünnung extrapoliert. Die resultierenden Kurven sind in Abb. 28 zu sehen.

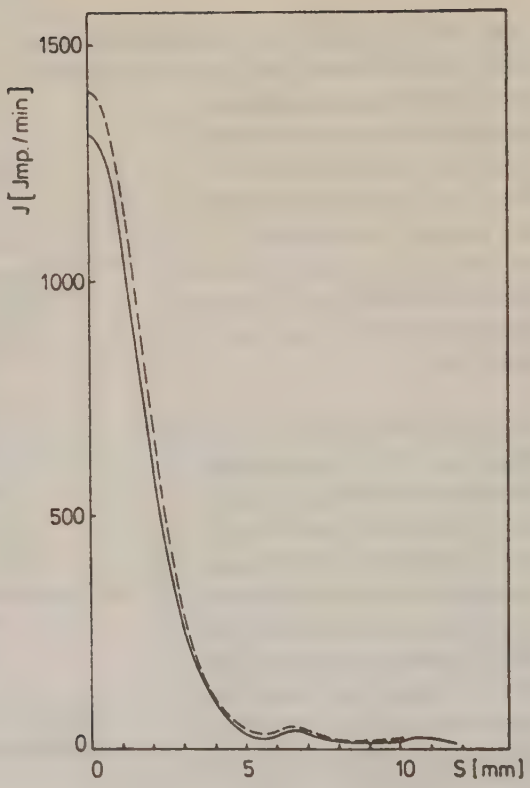


Abb. 28 Auf Konzentration c = O extrapolierte, verschmierte Streukurven von Kat1 (– – – –)u. Kat5 (——).

5253 Entschmierte Streukurven

In Abb. 29, 30 sind die Partikelstreukurven von Kat1 und Oxy-Hb bzw. Kat5 und Oxy-Hb nach Entschmierung mittels des Hoßfeldprogramms abgebildet. Durch die Entschmierung vergrößerten sich die absoluten Intensitäten, die Steigung bei kleinen Winkeln blieb praktisch identisch, das gleiche gilt auch für die Lagen der Nebenmaxima.

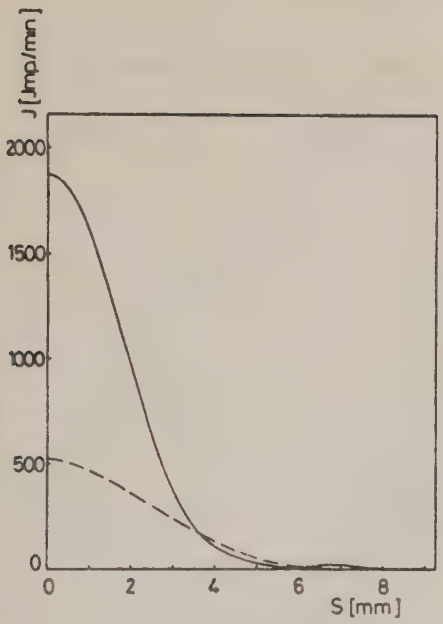


Abb. 29 Entschmierte Streukurve von Kat1 (———) und Oxy-Hb (-·-·-·-).

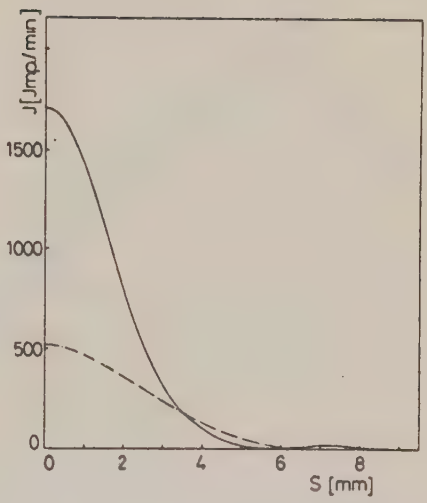


Abb. 30 Entschmierte Streukurve von Kat5 (———) und Oxy-Hb (-·-·-·-·-).

An dieser Stelle ist zu vermerken, daß die Lagen der Nebenmaxima im Bereich der meßtechnischen Genauigkeit sehr präzise bestimmbar waren, nicht jedoch ihre Höhen.

Zur Bestimmung der Streumassenradien wurden die entschmierten Streukurven in Guinierscher Auftragung dargestellt. Aus den Steigungen der Geraden ließen sich nach Gleichung (44) die Streumassenradien R_s bestimmen. Sie berechneten sich nach Abb. 31 zu folgenden Werten:

Streumassenradius $_{Kat1}$: 38,0 Å

Streumassenradius $_{Kat5}$: 39,2 Å

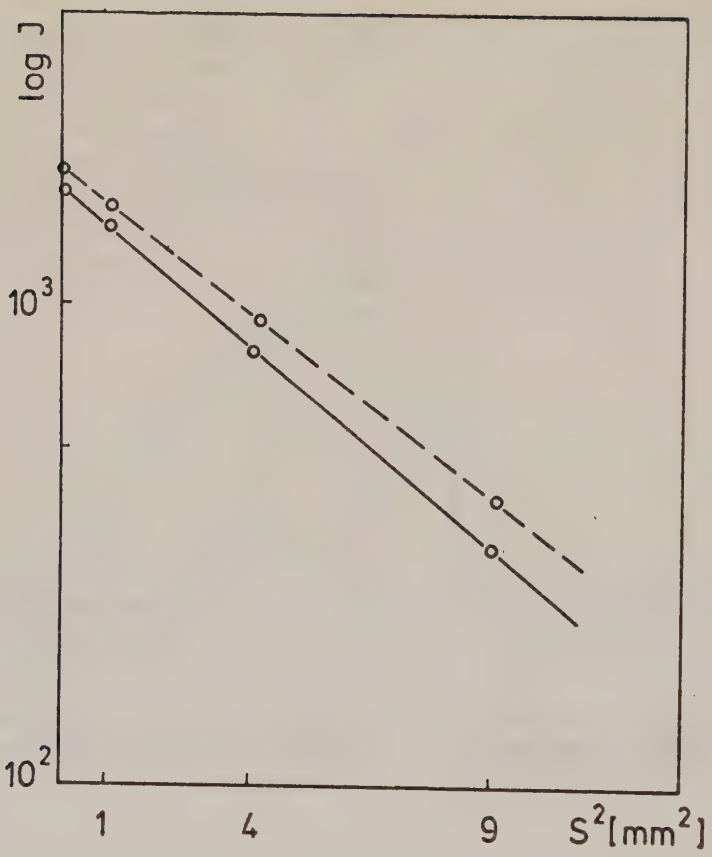


Abb. 31 Entschmierte Streukurven von Katalase in Guinierauftragung.
----- = Kat1, ——— = Kat5.

5254 Porodsche Invarianten

Die Porodsche Invariante (s. 423) $\widetilde{Q}$ wurde aus den Streukurven (nicht entschmierte) mittels Gleichung (51) nach entsprechender Auftragung (Is gegen s, s. Abb. 32) entnommen.

Es ergaben sich folgende Werte für $\widetilde{Q}$:

Kat1:	4385	$\frac{\text{Imp x mm}^3}{\text{min}}$
Kat5:	3835	"

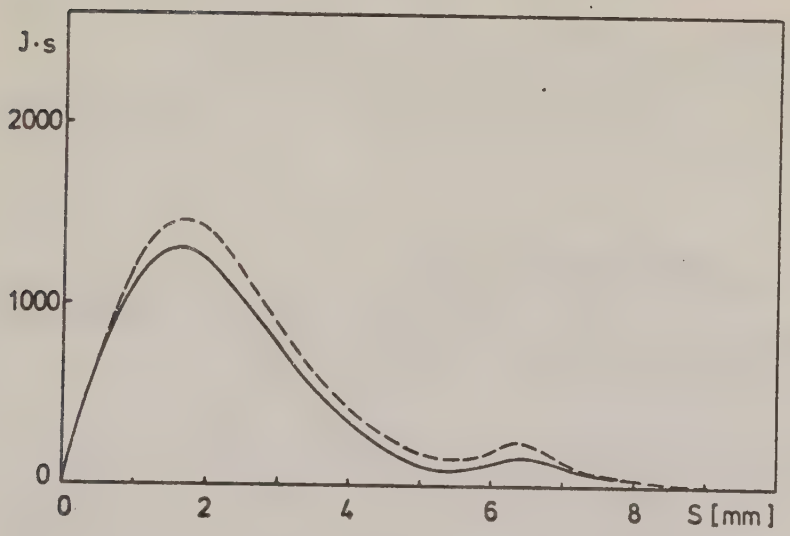


Abb. 32 Porodsche Invarianten aus den verschmierten Kurven von Kat1 (------) und Kat5 (——).

5255 Volumenbestimmung

52551 Aus der Porodschen Invariante

Wie im methodischen Teil ausführlich dargestellt (423), ist das Volumen eines Partikels dem Quotienten $\widetilde{I}_o/\widetilde{Q}$ bei verschmierten Streukurven proportional. Es gilt:

$$V = \widetilde{I}_o / \widetilde{Q} \times 1{,}405 \times 10^6 \quad [\text{Å}^3]$$

I_o beträgt für Kat1 1400 Imp/min, für Kat5 1310 Imp/min. Nach obiger Gleichung errechnet sich daraus für Kat1 ein Volumen von $4{,}52 \times 10^5$ Å^3, während sich das Volumen von Kat5 zu $4{,}83 \times 10^5$ Å^3 ergibt.

52552 Durch Vergleich mit Oxy-Hb

Eine andere Methode der Volumenbestimmung als mit der Porodschen Invariante ergibt sich aus dem Vergleich der verschmierten Nullintensitäten des zu messenden Proteins mit Proteinen bekannten Volumens und Molekulargewichtes. Unter der Voraussetzung gleicher Proteindichten verhalten sich die entschmierten Nullintensitäten wie die Molekulargewichte:

$$I_o \sim c \cdot M_{red} = c \cdot M \cdot (\varrho - \varrho_o)^2$$

Dabei ist M_{red} das sogenannte reduzierte Molekulargewicht, ϱ bzw. ϱ_o die Elektronendichte des Proteins bzw. des Lösungsmittels. Nach Gleichung (44) und (53) gilt also:

$$\frac{\widetilde{I}_{o\,Hb}}{\widetilde{I}_{o\,Kat}} = \frac{M_{Hb}}{M_{Kat}} \cdot \frac{R_{sKat}}{R_{sHb}} \qquad (54)$$

Für das Molekulargewicht von Oxy-Hb wurde der Wert 64.000, für sein Volumen sowohl der theoretisch berechnete Wert von 1,13 x 10^5 Å^3 (131) als auch der experimentelle Wert von 1,3 x 10^5 Å^3 (108) zugrunde gelegt, sein Streumassenradius wurde zu 24,6 Å gemessen.

Nach Gleichung (54) ließ sich das Molekulargewicht von Rinderleberkatalase aus den entsprechenden gemessenen Größen zu 246.000 berechnen. Aus dem theoretisch berechneten Oxy-Hb-Volumen ergaben sich für das Molekülvolumen von Katalase 4,30 x 10^5 Å^3, während der Wert für das Molekülvolumen von Katalase bei Verwendung des experimentell ermittelten Volumens von Oxy-Hb 4,95 x 10^5 Å^3 betrug.

5256 Ermittlung der Form der Katalasemoleküle

52561 Anisotropiefaktoren

Ein grobes Maß für die Form eines Partikels ist sein Anisotropiefaktor f. Dieser gibt die Abweichung von der Kugelgestalt wider:

$$f = \frac{R_S}{R_{S_K}}$$

R_{S_K} ist der Streumassenradius, den eine Kugel mit dem Volumen V hat. Unter der willkürlichen Annahme, daß die unter 52551 aufgeführten Volumina von Kat1 bzw. Kat5 die Volumina von Kugeln sind, kann auch deren Streumassenradius bestimmt werden:

$$R_S = \sqrt{\frac{3}{5}} \times r, \quad \text{wobei} \quad r = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}}$$

Man kommt zu folgenden Ergebnissen:

	V	R_{s_K}	f
Kat1	$4,52 \times 10^5$ Å^3	36,9	1,03
Kat5	$4,83 \times 10^5$ Å^3	37,7	1,04

52562 Vergleich mit theoretischen Streukurven

Streumassenradius und Volumen ermöglichen lediglich eine ungefähre Aussage über die Teilchendimensionen, zumal man, wie bereits erwähnt wurde, willkürliche Annahmen treffen muß, um die Größen zu interpretieren. Einen großen Vorteil bietet hingegen u. U. der Vergleich der experimentellen Kurven mit theoretischen. Die theoretischen Kurven sind für einige Körper mit drei (bzw. zwei) verschiedenen Achsen berechnet worden (113, 114 115), man ist also hier frei von der Willkür eines Rotationskörpers. Die Auswahl an berechneten Streukurven beschränkt sich allerdings auf sehr einfache geometrische Formen, was seine Ursache in der großen Schwierigkeit hat, die Integrale über komplizierte Ladungsverteilungen auszuführen, bzw. die charakteristischen Funktionen zu berechnen.

Es hat sich herausgestellt, daß selbst relativ große Änderungen der Teilchengestalt nur geringfügige Änderungen der Streukurve bewirken und daß erst die sehr intensitätsschwachen Nebenmaxima als empfindliche Formanalysatoren zu betrachten sind. (Die Nebenmaxima sind in fast allen Fällen um mindestens einen Faktor 100 intensitätsschwächer als der zentrale Hauptpeak!)

Aus der zuletzt erwähnten Tatsache läßt sich die Schwierigkeit entnehmen, die sich der experimentellen Auffindung der Nebenmaxima entgegenstellt und damit eine genaue Formanalyse erschwert.

Um nun die intensitätsschwachen Nebenmaxima, die, wie schon gesagt, sehr formempfindlich sind, in der praktischen Durchführung der Angleichung hervorzuheben, werden sowohl die experimentelle als auch die theoretische Kurve in einem doppeltlogarithmischen Maß aufgetragen, wobei auf $I_o = 1$ normiert wird. Die Nebenmaxima kommen dadurch in die gleiche Größenordnung

wie das zentrale Hauptmaximum.

Diese Art der Auftragung, vor allem die logarithmische Abszissenskala, hat aber noch einen anderen praktischen Grund. Die theoretischen Kurven sind im allgemeinen nicht als Funktion des Streuwinkels (bzw. h oder s) berechnet und tabelliert, sondern als Funktion von Produkten von h und irgendwelchen teilchencharakteristischen Größen (bei Kugeln der Radius, bei regelmäßigen Körpern der Streumassenradius R_s, bei allgemeineren Körpern die größte Querschnittsabmessung D). Werden nun die theoretischen Streukurven gegen eine logarithmische Abszisse aufgetragen, so behält sie ihren räumlichen Verlauf und ist nur parallel zu sich selbst auf der Abszissenachse verschoben, denn es ist bekanntlich log (hr) = log h + log r. Nach dem Auftragen der experimentellen Kurve gegen log h (oder log s) ergibt sich der Teilchenparameter r (oder jeder andere, der in das Abszissenprodukt eingeht) aus der Abszissendifferenz, sobald sich beide Kurven decken.

Zur Auswertung der experimentellen Streukurven von Kat1 und Kat5, die zunächst in einer Auftragung über log s vorlagen, wurden dieselben über log h x R_s aufgetragen. Entsprechend wurden auch die theoretischen Kurven behandelt. Sowohl der Anisotropiefaktor f als auch die elektronenoptischen Aufnahmen lassen erkennen, daß es sich bei den gemessenen Proteinen um kugelähnliche Partikel handelt. Aus diesem Grunde beschränkte sich der Vergleich auf Zylinder, Hohlzylinder und Ellipsoide, die in ihren Achsenverhältnissen wenig von der Kugel abwichen.

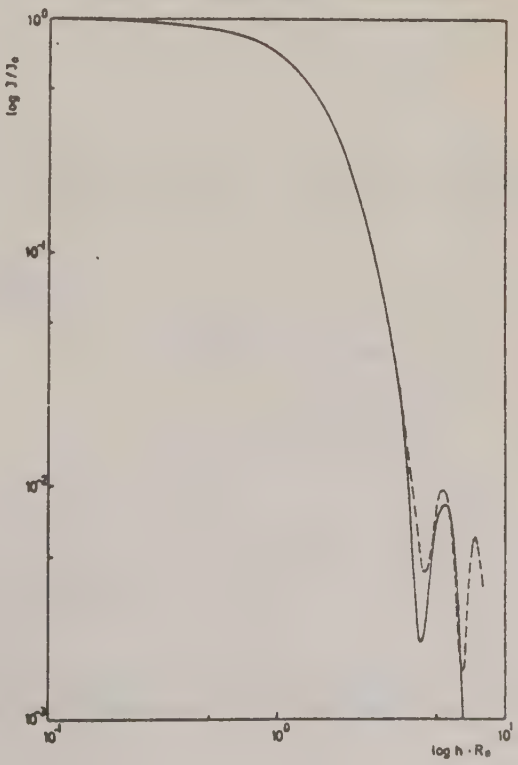


Abb. 33 Entschmierte Streukurven von Kat1 (----) und Kat5 (———).

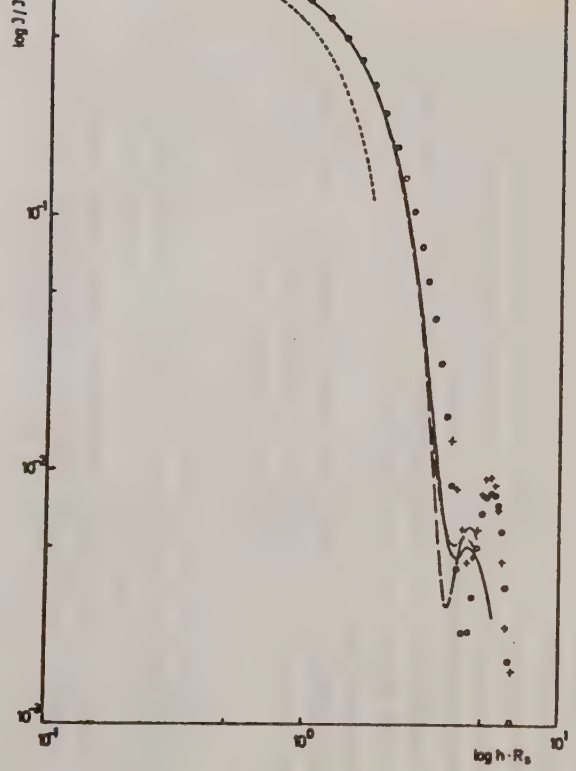


Abb. 34 Theoretische Streukurven von Ellipsoiden (R_s = 40 Å).
------ Kugel (Radius r). — — — Rotationsellipsoid (1 : 1 : 0, 75)
—·—·— Rotationsellipsoid (1: 1 : 2/3). ——— Ellipsoid (0, 75:1:1, 2)
+ + + = Kat1 ● ○ ○ = Kat5

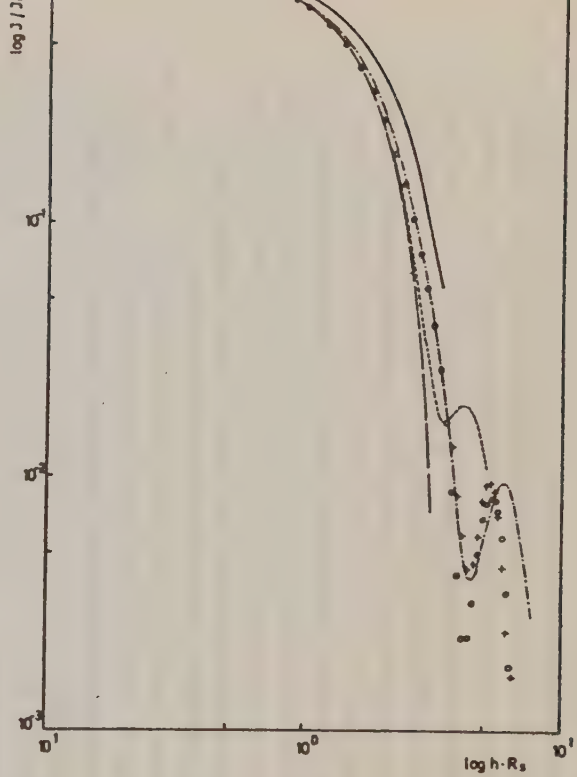


Abb. 35 Theoretische Streukurven von Hohlzylindern (R_s = 40 Å)
$r_i : r_a$ = 0, 3; v = H/2r_a.
———v = 1, 5. —·—·—v = 1,2 .- - - -v = 0, 6. — — — v = 0, 9.
+ + + = Kat1 ○ ○ ○ = Kat5

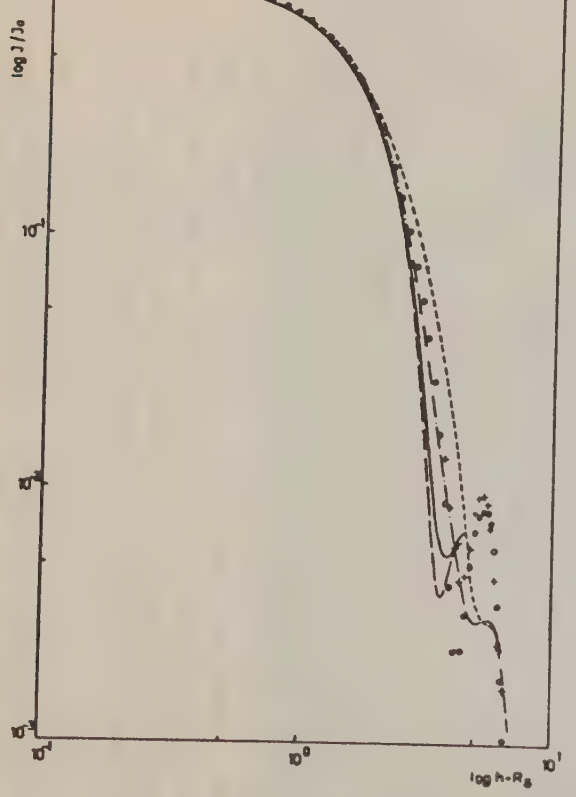


Abb. 36 Theoretische Streukurven von elliptischen Zylindern. (R_S = 40 A). Halbachsen a, b, Höhe H, v = H/2a.
– – – – – b : a = 2/3; v = 1, 5. —·—·— b : a = 0, 75; v = 1, 2.
——— b : a = 2/3; v = 0, 75. — — — b : a = 0, 75; v = 0, 75.
+ + + = Kat1 o o o = Kat5

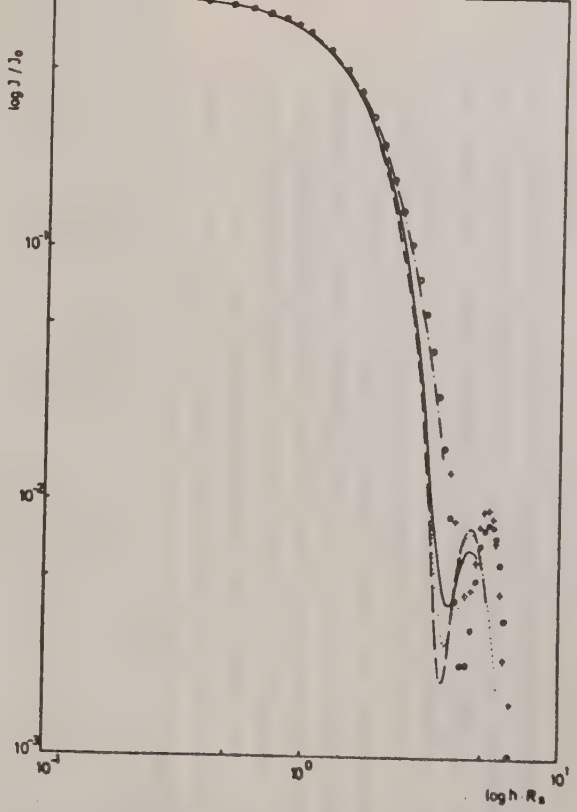


Abb. 37 Theoretische Streukurven von Kreiszylindern (R_S = 40 A
Radius r, Höhe H, v = H/2r.
—·—·— v = 1, 4. ——— v = 1, 1. ····· v = 1. — — — v = 0, 9.
+ + + = Kat1. o o o = Kat5

Wie Abb. 34 zeigt, kann mit großer Wahrscheinlichkeit für die Form der Katalasemoleküle die "exakte" Kugel ausgeschlossen werden, da ihre theoretische Streukurve schon im inneren Bereich wesentlich von den experimentellen abweicht.

Von den zur Auswahl stehenden Streukurven ergibt sich die beste Angleichung an beide experimentellen Kurven durch die theoretische Streukurve des elliptischen Zylinders mit den Halbachsen a und b und der Höhe H, wobei b : a = 0, 75 und H = 2, 4 sind. Eine ebenfalls diskutable Anpassung läßt sich mit den Streukurven eines Kreiszylinders mit Radius r und Höhe H = 1, 4 x 2 r bzw. eines Hohlzylinders, dessen Innenradius r_i zum Außenradius r_a im Verhältnis 0, 3 : 1 steht und dessen Höhe H = 1, 5 x 2 r_a beträgt, finden. daraus errechnen sich folgende Werte für Halbachsen und Höhen dieser drei Körper:

Elliptischer Zylinder: a = 43 Å, b = 32, 2 Å, H = 103 Å

Kreiszylinder: r = 37, 5 Å, H = 105 Å

Hohlzylinder: r_a = 35, 3 Å, r_i = 11, 9 Å, H = 106 Å

Das Volumen des ellyptischen Zylinders ergibt sich aus diesen Werten zu 4, 45 x 10^5 $Å^3$, das des Kreiszylinders zu 4, 62 x 10^5 $Å^3$, das Volumen des Hohlzylinders hat den Wert von 4, 15 x 10^5 $Å^3$.

526 Elektronenmikroskopie

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man deutlich, daß das Katalasemolekül kubische, oktaedrische oder kugelförmige Gestalt haben muß. Die Lage der Moleküle auf dem Trägerfilm ist statistisch und Formen, wie z. B. Zylinder, Stäbchen, Ellipsoide etc., müssen erkannt werden können (s. Hämocyanin). Sie wurden im Falle der Katalase nie gefunden. Untereinheiten konnten auf den vorliegenden Bildern (mit absichtlich erhöhtem Phasenkontrast) nicht erkannt werden. Auch bei Aufnahmen mit Amplitudenkontrast konnten Untereinheiten, wenn überhaupt, nur hineininterpretiert werden. Kat1 und Kat5 lieferten analoge Bilder. Größenmessungen des Katalasemoleküls konnten an den stark unterfokussierten Bildern nicht gemacht werden, und Bilder im Fokus zeigten zu flaue Kantenkontraste, um dererlei Messungen durchführen zu können.

Ein Unterschied zwischen Kat1 und Kat5 war deutlich reproduzierbar: Kat1 spreitete auf dem Kohlefilm wesentlich schlechter als Kat5 und zeigte stets "Nester" von aggregierten Molekulen, während Kat5 regelmäßig verteilte, einzeln liegende Molekule ergab. Dies sollte als ein Hinweis fur eine stärker hydrophobe Oberfläche von Kat1 als die von Kat5 angesehen werden.

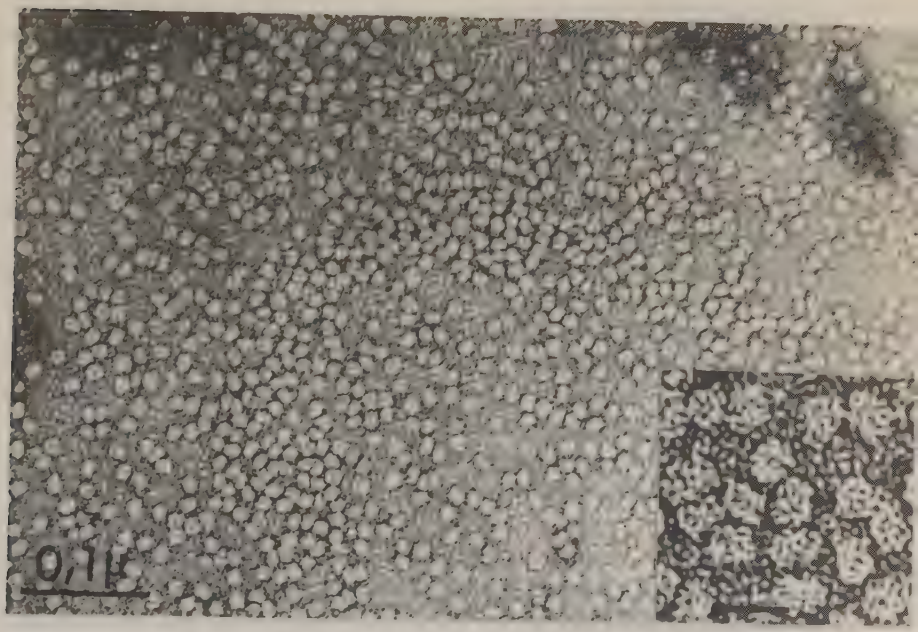


Abb. 38 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Kat1 bzw. Kat5 im "negativ-staining"-Verfahren. Vergrößerung 60.000 x 3; Ausschnitt 60.000 x 8 (Strich = 200 Å).

6 Diskussion

61 Chromatographische und elektrophoretische Unterschiede zwischen Kat1 und Kat5

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnten mehrere Autoren bei Erythrozytenkatalase und bei Leberkatalase verschiedener Säuger chromatographische und elektrophoretische Heterogenitäten der hochgereinigten Enzyme nachweisen, wobei die Ursache für diese Heterogenitäten stets Gegenstand widersprüchlicher Diskussionen war.

Zur Überprüfung bzw. Präzisierung dieser Ergebnisse wurde Rinderleberkatalase, von der 5 verschiedene Spezies (Kat1, Kat2, Kat3, Kat4 und Kat5) existieren, untersucht. Da die größten Unterschiede, die die einzelnen Spezies untereinander aufweisen, zwischen Kat1 und Kat5 zu erwarten waren, wurden zunächst diese Proteine isoliert. Dies geschah durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex bei pH 7, 9 (s. 5111). Dabei zeigte sich, daß im Eluat der Säule auch Katalasespezies erschienen, die nicht in der Ausgangssubstanz enthalten waren, d. h. sie mußten neu entstanden sein. Als erstes Protein wurde Kat1 durch den NaCl-Gradienten von Austauscher eluiert, während Kat5 erst zum Schluß erschien. Offensichtlich hatte Kat1 unter den Bedingungen der Chromatographie (pH-Wert, Ionenkonzentration) weniger geladene Gruppen auf ihrer Oberfläche als Kat5.

Dieses Resultat wurde unterstützt durch die Ergebnisse der elektrophoretischen Analyse der einzelnen Fraktionen der DEAE-Sephadex-Chromatographie (s. 5111). In einem 7, 5 %igen Polyacrylamidgel von pH 8, 5 bewegte sich Kat5 um den Faktor 1, 7 schneller als Kat1.

Diese chromatographischen und elektrophoretischen Effekte könnten auf der Basis verschiedener Molekulargewichte und damit verschiedener Molekülvolumina gedeutet werden. Wie jedoch von Heidrich (33) durch Sedimentationsgleichgewichtsläufe in der Ultrazentrifuge bewiesen wurde, besitzen Kat1 und Kat5 identisches Molekulargewicht. Darüber hinaus zeigten die durch Röntgenkleinwinkelstreuung gemessenen Volumina (s. 52551) der beiden Katalasespezies einen Unterschied von ca. 7 %, um den Kat5 voluminöser war als Kat1. Die Tatsache, daß Kat5 aber eine höhere elektrophoretische Beweglichkeit besaß als Kat1, kann somit

nur durch Unterschiede, die zwischen den Oberflächenladungen der untersuchten Katalasekomponenten bestehen, erklärt werden.

Einen eindeutigen Beweis für das Vorhandensein von Oberflächenladungsunterschieden erbrachte die Methode des isoelektrischen Fokussierens (s. 5112), da dabei eine Trennung nur aufgrund verschiedener isoelektrischer Punkte erfolgt. Es zeigte sich, daß Kat1 den IP bei pH 6,55 hat, während der IP von Kat5 bei pH 5,60 liegt, was einer Differenz von 0,95 pH-Einheiten entspricht. Da eine Verschiedenheit der isoelektrischen Punkte aber nur durch eine Verschiedenheit in der Oberflächenbeschaffenheit bzw. -ladung erklärt werden kann, war bewiesen, daß Kat1 und Kat5 in ihren Oberflächenladungen differieren. Dabei stand die Tatsache, daß der IP von Kat5 mehr im Sauren liegt als der von Kat1, völlig im Einklang mit dem beschriebenen chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten beider Spezies im alkalischen Medium.

Diese qualitative Aussage konnte mittels einer trägerfreien Elektrophorese, d. h. einer Elektrophorese, bei der praktisch nur die Partikelladungen für die Wanderungsgeschwindigkeit (bzw. Ablenkung) verantwortlich sind, quantitativ präzisiert werden (s. 5113). Durch Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Kat1 und Kat5, welche in Tris-Acetat-Puffern verschiedener Ionenstärken (aber des gleichen pH-Wertes von 8,5) gelöst waren, wurden zunächst mittels der Henry-Gleichung scheinbare Teilchenladungen $\bar{\varphi}$ ermittelt. Die über den zugehörigen Ionenstärken aufgetragenen $\bar{\varphi}$-Werte sollten nach der Theorie sowohl für Kat1 als auch für Kat5 je eine Gerade ergeben, die nahezu parallel zur Abszisse verläuft. Als unbefriedigendes Ergebnis resultierten jedoch 2 monotone Kurven. Der Grund für diese Abweichung konnte in der Tatsache gefunden werden, daß das Volumen der Trisionen des Puffers in der Größenordnung des Volumens der Katalasemoleküle ist. Dadurch waren die Voraussetzungen für die Henry-Gleichung nicht mehr erfüllt. Die Anwendung der von Gorin geänderten Henry-Gleichung, in der auch der Partikelradius der Elektrolytionen berücksichtigt wird, ergab schließlich 2 Geraden (s. Abb. 10) für die beiden Katalasespezies. Die tatsächlichen Teilchennettoladungen ließen sich schließlich durch graphische Extrapolation der beiden Geraden auf unendliche Pufferverdünnung finden. Danach hat bei pH 8,5 Kat1 25,8 Elemen-

tarladungen auf der Oberfläche, Kat5 dagegen 32, 7. D. h. daß Kat5 eine um 12, 7 % höhere Ladung besitzt als Kat1.

62 Untersuchungen zur Primärstruktur von Kat1 und Kat5

Zur vergleichenden Untersuchung der beiden Katalasespezies Kat1 und Kat5 wurde zunächst eine Aminosäureanalyse durchgeführt (s. 515). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, die gefundenen Werte lagen jedoch alle geringfügig unter den von Schroeder et al. (133) angegebenen. Bei Berücksichtigung des hohen Molekulargewichtes der untersuchten Proteine konnten die geringfügigen Differenzen zwischen den aus 4 Analysen resultierenden Mittelwerten als innerhalb der Fehlergrenze liegend bezeichnet werden. Keinesfalls ließ sich jedoch daraus der zwischen Kat1 und Kat5 bestehende Ladungsunterschied herleiten. Besonderer Wert wurde bei den Analysen auf die exakte Erfassung der Aminosäuren Cystein, Lysin und Tyrosin gelegt, da mit deren Hilfe in anderen Experimenten (s. 516, 517 und 522) versucht wurde, Hinweise über die höheren Strukturen beider Enzyme zu gewinnen. Lysin und das wegen seiner Säurelabilität zu Cysteinsäure oxidierte Cystein/Cystin wurden auf dem automatischen Aminosäureanalyzer bestimmt. Neben der Ermittlung der Absolutwerte dieser Verbindungen wurden auch von jedem Lauf ihre Verhältniswerte zu anderen, durch besondere Stabilität und gute Analysierbarkeit ausgezeichneten Aminosäuren (Val, Phe), ermittelt. Dabei war kein Unterschied zwischen Kat1 und Kat5 erkennbar. Dies trifft auch auf die Tyrosingehalte zu, welche wegen der Säurelabilität dieser Aminosäure spektroskopisch erfaßt wurden (s. 515).

Neben der Aminosäureanalyse wurden analytische Peptidmuster von den mit TPCK-Trypsin gespaltenen Katalasespezies Kat1 und Kat5 (s. 514) gemacht. Diese Methode verfügt erwiesenermaßen über hohe Empfindlichkeit (59, 134), hat andererseits aber auch den Nachteil, daß während der Aufarbeitung saure Peptide verlorengehen. Diese Tatsache muß bei der Bewertung des Ergebnisses, welches keinen Unterschied zwischen Kat1 und Kat5 zeigte, kritisch berücksichtigt werden. Andererseits kann dieses Ergebnis zumindest als guter Hinweis zur Gleichheit der Primärstruktur der untersuchten Proteine betrachtet werden, da der Anteil der

unlöslichen, sauren Peptide gering (ca. 8 %) war.

Wurden bei der Aminosäureanalyse die Bausteine und beim "peptide-mapping" größere Bereiche der Polypeptidketten untersucht, so stellte die Acrylamidgelelektrophorese in 8 M Harnstoff eine Analyse der kompletten, jedoch völlig aufgefalteten Untereinheiten dar (s. 5121). Dabei zeigte sich, daß sämtliche 5 Spezies der Rinderleberkatalase, also auch Kat1 und Kat5, nicht aus identischen Untereinheiten, sondern aus mehreren verschiedenen in gleicher Weise zusammengesetzt sind. Dies steht im Widerspruch zu einem Ergebnis von Schroeder et al. (116), nach welchem Rinderleberkatalase identische Untereinheiten besitzen soll. Durch verschiedene Vorsichtsmaßnahmen, wie Entfernung von eventuell noch vorhandenem Ammoniumperoxodisulfat und Anwesenheit von β-Mercaptoäthanol zur Verhinderung von Oxidationen (z. B. Bildung von Disulfidbrücken), quantitative Ablösung der prosthetischen Gruppe mit Aceton-HCl und Überprüfung der völligen Auffaltung der Polypeptidketten mit 8 M Harnstoff durch ORD-Messungen (s. 523) konnte jedoch das Zustandekommen mehrerer Banden bei der Discelektrophorese aus einer Art von Polypeptidkette weitgehend ausgeschlossen werden. 3 Möglichkeiten blieben allerdings noch offen, nämlich Desaminierung, die Entstehung von Bruchstücken mit niedrigeren Molekulargewichten als 60.000 und die unspezifische Bildung von Aggregaten mit höheren Molekulargewichten (ganzzahligen Vielfachen von 60.000).

Es ist bekannt, daß Desaminierung besonders an Glutamin und Asparagin auftreten kann. Der exakte Nachweis dieser Reaktion kann nur mit sehr aufwendigen Methoden der Primärstrukturanalyse geführt werden. Nachdem die obenerwähnten 6 Banden unter den verschiedensten Milieu- und Reaktionsbedingungen konstant und reproduzierbar auftraten, liegen gute Gründe vor, diese unspezifische Reaktion der Desaminierung auszuschließen.

Auch die Entstehung von Bruchstücken mit niedrigeren Molekulargewichten als 60.000 muß abgelehnt werden, da die herrschenden Bedingungen erfahrungsgemäß nicht geeignet waren, Peptidbindungen zu spalten, und die SDS-Elektrophorese nach Laemmli (s. 5122) eindeutige Ergebnisse in dieser Richtung brachte. Kat1 und Kat5 wurden in den bei der Acrylamidgelelektrophorese (s. 5121) verwendeten

Probenpuffer (8 M Harnstoff, 1 % β-Mercaptoäthanol) über Nacht inkubiert und erst dann gegen den 2 % SDS enthaltenden Probenpuffer dialysiert. Sollten sich Bruchstücke gebildet haben, so hätten sich deren SDS-Komplexe mit Sicherheit elektrophoretisch heterogen verhalten, es wären mehrere Banden aufgetreten. Dieser Fall konnte nie beobachtet werden. Die Primärstruktur der kleinsten chemischen Untereinheiten von Rinderleberkatalase wurde also durch das Einwirken von 8 M Harnstoff und 1 % β-Mercaptoäthanol nicht angegriffen, es war folglich keine Spaltung der Untereinheiten zu Bruchstücken eingetreten. Das Molekulargewicht dieser Untereinheiten konnte mittels einer Eichkurve (erstellt aus Proteinen bekannter Molekulargewichte) in der SDS-Elektrophorese zu 60.000 bestimmt werden.

Auch die Bildung von Aggregaten war von vorneherein nicht sehr wahrscheinlich, weil sich deren elektrophoretische Wanderungsstrecken umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte verhalten hätten (s. SDS-Elektrophorese bzw. elektrophoretisches Verhalten von Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer des Rinderserumalbumins), was in Abb. 11 augenscheinlich nicht der Fall ist. Da das am schnellsten wandernde Polypeptid eine ca. 1,6 mal größere Strecke im Gel zurücklegte als das langsamste, sollten beide Proteine - unter der Annahme, daß diese Differenz auf Molekulargewichtsunterschieden beruht - auch durch Gelfiltration trennbar sein. Bei der Chromatographie an Sephadex G 200 in Anwesenheit des gleichen Puffers, der bei der Acrylamidgelelektrophorese (s. 5121) Verwendung fand, erschienen die denaturierten Katalaseuntereinheiten jedoch in einem einzigen Gipfel, dessen Maximum ein Elutionsvolumen aufwies, das anhand von Eichsubstanzen einem Molekulargewicht von 60.000 zugeordnet werden konnte. Dieser Wert steht in völliger Übereinstimmung mit dem durch SDS-Elektrophorese (s. 5122) erhaltenen. Dies ließ einerseits den Schluß zu, daß nur Polypeptidketten gleichen oder sehr ähnlichen Molekulargewichtes in der nativen Katalase enthalten sind. Andererseits nährte es die Vermutung, daß die in Anwesenheit von 8 M Harnstoff zu beobachtende elektrophoretische Heterogenität auf kleine Ladungsverschiedenheiten zurückzuführen ist, was nur mit einer geringfügig unterschiedlichen Primärstruktur erklärt werden kann. Ähnliche kleine Aminosäureaustausche ("amino acid multiplicity"), die keine Auswirkung auf die physiologische Funktion des Moleküls haben, wurden in der letzten Zeit mit Hilfe der perfektionierten Analysentechniken häufig beobachtet, und zwar beson-

ders bei Hämoglobinen von Mensch und Tier (135, 136).

Im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Molekulargewichten der Katalaseuntereinheiten von 60.000 stehen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die teilweise erheblich davon abweichen. Deisseroth fand einen Wert von 88.000 (132), Hiraga von 25 - 29.000 (123) und Valentine sogar nur von 14.000 (129). Allerdings - und dies scheint die Ursache für die große Diskrepanz zu sein - wurden die Messungen an Katalaseproteinen mit Hilfe von Ultrazentrifugationstechniken zum Teil in Gegenwart von 1 M Ameisensäure durchgeführt. Es ist nämlich zu beachten, daß die Theorie der Ultrazentrifuge streng nur für Zweikomponentensysteme mit ungeladenen Teilchen entwickelt wurde. Trotzdem kann sie auch bei Proteinlösungen mit Erfolg angewendet werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Anwesenheit von genügend konzentrierten Neutralsalzlösungen und ein pH-Wert, der möglichst nahe am isoelektrischen Punkt des Polyelektrolyten liegt. Dies war natürlich in dem stark sauren Milieu nicht gegeben und daher wurde fälschlicherweise ein so niederes Molekulargewicht gefunden.

Die Zuverlässigkeit der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Elektrophorese (bzw. der Erkennung von Polypeptiden verschiedener Molekulargewichte) wurde in den letzten Jahren von vielen Autoren (37, 117, 118, 119) demonstriert. Nur ganz wenige Ausnahmen, wie Kollagenpeptide (120), Histone (121) oder gewisse Virusproteine (122), sind bisher bekannt, bei denen die gefundenen Molekulargewichte etwas stärker von den durch andere, zuverlässige Methoden bestimmten Molekulargewichten abwichen. In allen Fällen wurde durch die vorhergehende Behandlung eine Trennung der Proteinuntereinheiten herbeigeführt.

63 Konformationsunterschiede zwischen Kat1 und Kat5

Da die Heterogenität der Rinderleberkatalase nicht durch differierende Eigenschaften ihrer Primärstruktur erklärt werden konnte, war es nötig, die nativen Moleküle auf Unterschiede im räumlichen Aufbau der Polypeptidketten zu untersuchen.

Als geeignete Mittel haben sich dabei schon häufig ORD- und CD-Studien erwiesen (124, 125). Diese führten jedoch im vorliegenden Fall zu keinem Erfolg. Sowohl die ORD- als auch die CD-Spektren waren bei Kat1 und Kat5 identisch, aber die Werte der spezifischen Drehung, die bei den ORD-Spektren gemessen wurden, waren nur halb so groß wie die von Samejima gefundenen. Die Überprüfung der gemessenen Katalasespezies mit selbst aus Rinderleber isolierter Katalase bestätigte die eigenen Ergebnisse. Der nach diesen Messungen berechnete α-Helixanteil für beide Spezies betrug 24 - 27 %.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 700 nm bis 190 nm zeigte, daß Kat1 und Kat5 im sichtbaren Bereich keine Unterschiede aufwiesen. Maxima und Lagen der Soretbanden (405 nm) beider Proteine waren identisch. Von 390 nm an abwärts lagen die Intensitäten von Kat1 jedoch unter denen von Kat5, was besonders deutlich beim Minimum bei 312 nm ($\Delta \varepsilon_M = 1 \times 10^4$) und beim folgenden Maximum bei 277 nm ($\Delta \varepsilon_M = 3 \times 10^4$) erkennbar war. Dieses Verhalten mußte die Folge geänderter Absorptionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren sein, weil deren Gehalt nach der Aminosäureanalyse bei Kat1 und Kat5 gleich war. Eine Änderung der Absorptionskoeffizienten bedeutete aber zugleich, daß die Umgebung der aromatischen Aminosäuren in beiden Spezies (gleicher Primärstruktur) verschieden sein mußte, also daß die Polypeptidketten, aus denen die Proteine gebildet sind, verschiedene Konformation aufwiesen.

Nachdem die Ergebnisse von Acrylamidgelelektrophorese, isoelektrischer Fokussierung und trägerfreier Elektrophorese eindeutig erwiesen, daß sich die einzelnen Katalasespezies in ihrer Oberflächenladungen unterschieden, wurde versucht, mit Hilfe spezifischer Reagenzien diese Oberflächen direkt zu untersuchen.

Eine Titration der Tyrosine von Kat1 und Kat5 mit Alkali führte zu verschiedenen Ergebnissen bei beiden Spezies (s. Abb. 21). Während bei Kat1 16 der 75 Tyrosine in der Nähe des pK-Wertes von isoliertem Tyrosin ionisiert wurden, verhielten sich bei Kat 5 nur 10 Tyrosine in der gleichen Weise, obgleich auch Kat5 75 Tyrosine pro Molekül besitzt (s. 515). Aber nicht nur die Zahl der "freien" Tyrosine war unterschiedlich, sondern auch der gesamte Verlauf der sigmoiden Titrationskurven, welche bei Kat5 gegenüber jenen von Kat1 deutlich ins Alkali-

sche verschoben waren. Dies kann dahingehend erklärt werden, daß der pK-Wert der Tyrosine von Kat5 im Gegensatz zu jenem von Kat1 durch benachbarte, geladene Gruppen weiter ins Alkalische verschoben war, oder daß die Hydroxylgruppen der Tyrosine von Kat5 durch Ausbildung von H-Brücken oder durch ihre sterische Lage im Inneren des Moleküls "verborgen" waren und erst infolge Auffaltung des Proteins durch größere Alkalimengen (als bei Kat1 notwendig) ionisierbar wurden, wobei dies eine höhere strukturelle Stabilität von Kat5 bedeuten würde. Jedenfalls können und müssen aufgrund der identischen Primärstruktur beider Katalasespezies alle diese aufgeführten Möglichkeiten und die differierende Anzahl der "freien" Tyrosine einem unterschiedlichen räumlichen Aufbau der Polypeptidketten zugeschrieben werden.

Auch das Resultat der Analyse von freien Aminogruppen und Sulhydrylgruppen bestätigte diese Folgerung. Aus den Ausführungen von Fields (57) geht hervor, daß die mit TNBS erfaßten Aminogruppen eines nativen Proteins repräsentativ für die an der Oberfläche des Moleküls befindlichen Lysinseitenketten sind (die ebenfalls mit TNBS reagierenden Sulfhydrylgruppen können rechnerisch eliminiert werden). Im vorliegenden Fall der Rinderleberkatalase reagierte bei gleichem Lysingehalt (s. 515) ein Molekül von Kat1 mit 42, 6 Molekülen TNBS, während ein Molekül Kat5 um 4, 4 weniger, nämlich nur 38, 2, Moleküle TNBS binden konnte. Die SH-Gruppenanalyse (s. 516) zeigte, daß bei Kat1 und Kat5 im nativen Zustand die gleiche Zahl von Thiolgruppen, nämlich jeweils 0, 9, pro Molekül mit DTNB titrierbar war. Nach Denaturierung mit Gu·HCl konnten bei Kat5 10 weitere, bei Kat1 aber nur 6, 1 weitere SH-Gruppen erfaßt werden. Nachdem beide Katalasen bei der Aminosäureanalyse gleichen Cysteingehalt aufwiesen, bedeutet dies, daß Kat1 zwei zusätzliche Disulfidbrücken hat.

Da Heidrich (33) zur Erklärung der Heterogenität der Rinderleberkatalase u. a. einen Oxidations-Reduktionsmechanismus (Bildung bzw. Spaltung von Disulfidbrücken) in Erwägung zog, bei dem er Kat1 die Rolle des Reduktionsproduktes zuschrieb, wurde auch der SH-Gehalt von DTT-behandelter Kat1 (s. 3226) überprüft. Überraschenderweise konnten die gleichen Werte wie bei "normaler" Kat1 (gewonnen durch bloße Chromatographie an DEAE-Sephadex) gefunden werden. Ob-

gleich DTT erwiesenermaßen eine stark umwandelnde Wirkung auf Rinderleberkatalase ausübt (zweistündige Einwirkung von 0,1 % DTT bei 37,5 °C ergab nahezu reine Kat1), ist es vielleicht doch nicht seine Reduktionskraft, die dies bewirkt, sondern eine andere, möglicherweise noch nicht bekannte Eigenschaft. Vielleicht kommt die reduzierende Wirkung von DTT aber auch nur intermediär unter Bildung eines Zwischenproduktes (durch Öffnung von Disulfidbrücken) zum Tragen, welches in einem weiteren Reaktionsschritt unter Bildung der zwei zusätzlichen S-S-Brücken zu Kat1 wird. Mit Sicherheit steht dagegen fest, daß Kat1 aus Kat5 nicht ausschließlich durch Reduktion von Disulfidbrücken entsteht, und daß umgekehrt nicht Kat5 aus Kat1 durch oxidative Bildung von Disulfidbrücken gebildet wird, weil Kat1, das vermeintliche Reduktionsprodukt, zwei S-S-Brücken mehr enthält als Kat5.

Die Frage, ob diese beiden Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten oder innerhalb derselben gebildet werden, konnte durch SDS-Elektrophorese, welche in Abwesenheit von β-Mercaptoäthanol durchgeführt wurde, geklärt werden. Dies war auch im Zusammenhang mit einer Beobachtung von Sund (105) von Bedeutung, welcher feststellte, daß Rinderleberkatalase in Gegenwart von SDS in ein langsamer sedimentierendes Dissoziationsprodukt zerlegt wurde, wobei aber nur eine 75 %ige Spaltung in monomere Untereinheiten vom Molekulargewicht 80.000 erreichbar war. Diesen Befunden stehen die im Versuch 5123 aufgeführten Ergebnisse gegenüber. Wie sich dort klar zeigte (s. Abb. 14), waren zwar nach halbstündiger Inkubation von Kat1 oder Kat5 in 0,1 % SDS bei 37,5 °C noch Bruchstücke mit zweierlei Molekulargewicht, nämlich 60.000 und 120.000, vorhanden, jedoch bereits nach zweistündiger Inkubation konnte nur noch eine sich elektrophoretisch einheitlich verhaltende Komponente nachgewiesen werden. Diese bewegte sich im 10 %igen Gel wie ein Protein vom Molekulargewicht 60.000. Spaltprodukte mit Molekulargewicht 80.000 konnten nie festgestellt werden. Am Rande sei hier noch bemerkt, daß bei Anwesenheit von 1 % β-Mercaptoäthanol bereits nach einer halben Stunde nur noch Untereinheiten vom Molekulargewicht 60.000 auffindbar waren. Offensichtlich war es die stabilisierende Wirkung von Disulfidbrücken, welche eine so rasche und vollkommene Spaltung bei Abwesenheit eines Reduktionsmittels verhinderte. Diese Disulfidbrücken können jedoch nicht zwischen, sondern müssen innerhalb der Untereinheiten sein, weil Kat1 und Kat5 durch bloße SDS-Einwirkung quantitativ in die kleinsten chemischen Einheiten spaltbar waren.

Absorptionsspektren, Tyrosintitration, Sulfhydryl- und Aminogruppenanalyse haben bereits in deutlicher Weise dargestellt, daß zwischen Kat1 und Kat5 nur konformative Unterschiede bestehen - abgesehen von den beiden zusätzlichen Disulfidbrücken der Kat1, welche Bindungen kovalenter Natur sind. Ein weiterer, überzeugender Beweis hierfür wurde in der Umwandelbarkeit von Kat1 und Kat5 gefunden, welche bereits von Aebi (31, 32) bei Erythrozytenkatalase und Heidrich (33, 34) bei Rinderleberkatalase beschrieben, aber in ihrem molekularen Mechanismus nicht aufgeklärt wurde. Durch diesen Effekt, der u. a. mittels Chromatographie an DEAE-Sephadex bzw. Einwirkung von DTT oder Ultraschallung erzielbar war, konnten Kat1 und Kat5 ineinander und in die drei anderen Spezies überführt werden. Unter der Annahme, daß Rinderleberkatalase aus vier Untereinheiten aufgebaut ist, und daß es zwei verschiedene Untereinheiten a und b gibt, ist Kat1 aus z. B. vier Untereinheiten a (aaaa), und Kat5 folglich aus den vier Untereinheiten b (bbbb) aufgebaut. Die drei anderen möglichen Spezies bestehen aus den entsprechenden Mischungen von a und b. Unterscheiden sich die Proteine a und b durch ihre Primärstruktur, (wie z. B. bei LDH), so spricht man von Isoenzymen und es ist nicht möglich, aus dem Molekül aaaa ein anderes (z. B. aabb oder bbbb) zu machen. Das gleiche gilt natürlich auch für das Molekül bbbb. Eine solche Umwandelbarkeit kann aber durch folgende zwei Modelle erklärt werden:

1) Die vier Untereinheiten des Proteins haben gleiche Primärstruktur. Jede einzelne Untereinheit ist jedoch in der Lage, die Konformation ihrer Polypeptidkette reversibel zu ändern. In diesem Fall kann aus der Untereinheit a (b) die Untereinheit b (a) entstehen und das Molekül aaaa (bbbb) kann verwandelt werden in die Moleküle aaab (bbba), a abb, abbb, (baaa) und bbbb (aaaa), so daß man insgesamt fünf verschiedene Konformere erhält.

2) Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der vier Untereinheiten sind stabil und unveränderlich. Jede Untereinheit kann sich jedoch z. B. durch Drehung um eine Achse räumlich in zweierlei Weise (a oder b) zu den übrigen drei Bestandteilen des Gesamtmoleküls einstellen, wobei gewisse Oberflächenabschnitte der einzelnen Untereinheiten unter Änderung der Oberflächenbeschaffenheit des ganzen Moleküls verdeckt bzw. aufgedeckt werden. Durch diese Möglichkeit der verschiedenen räumlichen Orientierung einer jeden Untereinheit sind - auf die gleiche Weise wie bereits unter 1) geschildert - ebenfalls die fünf verschiedenen Katalasemoleküle erklärbar. (Ein solcher Effekt wurde von Muirhead et al. (110, 111, 112) durch Röntgenstrukturanalyse am Oxy- bzw. Deoxyhämoglobin nachgewiesen.

Er konnte dabei zeigen, daß sich die α- und β- Ketten während des Oxygenierens um bestimmte Achsen drehen und eine - allerdings vernachlässigbare - Translation parallel zu diesen Achsen mitmachen.) Diese beiden Modelle erscheinen als die einzige Möglichkeit, das beschriebene Verhalten von Rinderleberkatalase zu erklären.

Die durch Röntgenkleinwinkelstreuung erhaltenen Daten unterstützen diese Ansicht im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Primärstruktur von Kat1 und Kat5. Die auf Konzentration 1 normierten und auf Konzentration 0 extrapolierten, verschmierten Streukurven unterschieden sich nur wenig in ihren Nullintensitäten, was als zusätzlicher Hinweis auf gleiche Molekulargewichte von Kat1 und Kat5 gedeutet werden kann. Als deutlich ungleich erwiesen sich dagegen die durch Guiniersche Auftragung der entschmierten Streukurven ermittelten Streumassenradien mit 38,0 Å bei Kat1 und 39,2 Å bei Kat5.

Die Volumenbestimmung der beiden Proteine wurde nach zweierlei Verfahren durchgeführt. Die Berechnung aus den Porodschen Invarianten ergab für Kat1 ein Volumen von $4,52 \times 10^5$ Å^3, für Kat5 betrug das Volumen aber $4,83 \times 10^5$ Å^3, was einen um 6,9 % größeren Rauminhalt eines Moleküls von Kat5 gegenüber einem Molekül von Kat1 bedeutet.

Die Berechnungen bei der auf dem Vergleich mit Oxy-Hb basierenden Methode der Volumenbestimmung wurden sowohl mit dem theoretisch ermittelten Volumen von Oxy-Hb als auch mit dem gemessenen Wert durchgeführt (s. 52552). Es ergaben sich demzufolge zwei differierende Ergebnisse für das Volumen des Rinderleberkatalsemoleküls, nämlich $4,30 \times 10^5$ Å^3 und $4,95 \times 10^5$ Å^3. Zwischen Kat1 und Kat5 konnte sich bei diesem Verfahren selbstverständlich kein Unterschied zeigen, da für beide Proteine gleiche Proteindichten vorausgesetzt wurden.

64 Folgerungen aus den erzielten Ergebnissen zu Struktur, Form und Heterogenität des Rinderleberkatalsemoleküls

SDS-Discelektrophorese und Gelfiltration in Gegenwart von 8 M Harnstoff zeigten, daß das Enzym aus Polypeptidketten mit dem Molekulargewicht 60.000 gebildet wird. Diese Untereinheiten verhielten sich in der Acrylamidgelelektrophorese heterogen, haben also unterschiedliche Ladungen, was sehr wahrscheinlich auf geringfügig differierender Amino-

säurekomposition beruht. Wie die negativen Analysen ergaben, sind weder Kohlehydrate noch Lipide an das Enzym gebunden.

Durch Hybridisierung von Kat1 mit Kat5 konnten sämtliche 5 Spezies dargestellt werden (s. 518). Dadurch ist bewiesen, daß Rinderleberkatalase aus vier Untereinheiten besteht, von denen zwei verschiedene Arten existieren. Dieses Ergebnis erklärt bzw. bestätigt die Ergebnisse von Margoliash et al. (126), welcher 4 prosthetische Gruppen (Protohämin) pro Molekül nachweisen konnte, und von Sund et al. (105), der 4 Eisenatome pro Molekül fand. Dieser Autor und Tanford et al. (48) schlugen auch aufgrund ihrer Sedimentations- und Diffusionsstudien an Rinderleberkatalse einen tetrameren Aufbau des Enzyms vor, während Samejima et al. (127, 128) 3 bzw. 6 Untereinheiten und Valentine (129) 18 Polypeptidketten pro Molekül postulierten.

Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelmessungen wurde versucht, Kenntnisse über die Form der Moleküle zu gewinnen. Erste Anhaltspunkte konnten anhand der Anisotropiefaktoren gewonnen werden. Diese wurden aus den Volumina von Kat1 bzw. Kat5, die mittels der Porodschen Invarianten gefunden wurden, ermittelt. Die Werte beider Katalasespezies wiesen nur eine geringe Abweichung von 1 ($f_{Kat1} = 1,03$, $f_{Kat5} = 1,04$) auf, was bedeutet, daß die Moleküle der Rinderleberkatalase in ihrer Form sehr kugelähnlich sind (wobei die Moleküle von Kat5 offensichtlich etwas mehr von einer "exakten" Kugel abweichen). Dies wurde auch durch die elektronenoptischen Aufnahmen bestätigt. Der Vergleich der experimentellen Streukurven mit theoretischen Streukurven einfacher geometrischer Körper zeigte in Übereinstimmung mit den Anisotropiefaktoren, daß die untersuchten Moleküle keine reine Kugelgestalt haben, da die experimentellen Streukurven bereits im inneren Bereich von der theoretischen Streukurve der Kugel abwichen. Die beste Streuäquivalenz zeigte ein elliptischer Zylinder, aber auch ein Kreiszylinder und ein Hohlzylinder kommen in Betracht (s. 52562). Die für diese Körper berechneten Volumina lagen sehr gut im Bereich des Wertes, der sich experimentell ergab.

Grundsätzlich muß bei diesen Erörterungen erwähnt werden, daß der Vergleich mit theoretischen Streukurven keine tatsächliche geometrische Anpassung darstellt, sondern daß man nur von Streuäquivalenz sprechen kann. Dies um so mehr, als die natürlich vorkommenden Eiweißmoleküle nie

so klare äußere Formen aufweisen, wie die mit ihnen verglichenen einfachen geometrischen Körper, und nur für diese sind die Streukurven berechnet.

Die bei reiner Rinderleberkatalase zu beobachtende Heterogenität im chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten konnte auf Konformationsänderungen zurückgeführt werden. Offensichtlich sind sämtliche Untereinheiten in der Lage, entweder zweierlei Kettenkonformationen einzunehmen oder durch zweierlei räumliche Orientierung im Molekül dessen Quartärstruktur zu verändern. (Das im denaturierten Zustand (8 M Harnstoff) beobachtete uneinheitliche elektrophoretische Verhalten der aufgefalteten Polypeptidketten, das unterschiedliche Primärstruktur anzeigte, hat auf diese Feststellung keinen Einfluß, da es bei Kat1 und Kat5 in völlig gleicher Weise zu beobachten war und deshalb für Struktur und Funktion des Enzyms nebensächlich ist.) Daraus erklärt sich bei einer aus 4 Untereinheiten gebildeten Quartärstruktur die Existenz von 5 verschiedenen Proteinen, die z. B. nach der Chromatographie von Kat5 an DEAE-Sephadex zu beobachten waren. Neben der Konformationsänderung findet auch die Bildung von Disulfidbrücken statt, so daß Kat1 2 S-S-Brücken mehr besitzt als Kat5. Diese Disulfidbrücken bilden sich aus SH-Gruppen, die im Inneren des Moleküls sind, denn während die nativen Moleküle von Kat1 und Kat5 eine Sulfhydrylgruppe hatten, wiesen die durch Gu·HCl aufgefalteten Moleküle bei Kat5 4 Thiolgruppen mehr auf als bei Kat1. Einer stabilisierenden Wirkung dieser Disulfidbrücken ist es wahrscheinlich auch zuzuschreiben, daß die bei der Ionenaustauschchromatographie erfolgte Veränderung der aufgetragenen Katalase vorwiegend in Richtung der Bildung von Kat1 erfolgte.

Durch Untersuchungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung konnte gezeigt werden, daß sich Kat1 und Kat5 in ihren Streumassenradien und ihren Volumina unterschieden (s. 5253 und 5255). Die Konformationsänderung bedingt also eine Volumenänderung. Da die Streukurven von Kat1 und Kat5 keinen Formunterschied der beiden Proteine erkennen ließen, und da auch ihre Anisotropiefaktoren fast gleich waren, konnte eine Begründung für die Volumenänderung auf der Grundlage einer Formänderung nicht gefunden werden. Vielleicht beruht die Volumenzunahme auf einer "Auflockerung" oder "Quellung" der Untereinheiten als Folge der Ände-

rung ihrer Kettenkonformation. Größere Bereiche typischer Proteinstrukturen, wie z. B. Faltblattstrukturen oder vor allem die α-helikalen Abschnitte, können dabei nicht verändert werden, da ORD- und CD-Spektren von Kat1 und Kat5 identisch waren. Die Volumenzunahme könnte aber bei entsprechender Form der Untereinheiten möglicherweise auch durch deren oben diskutierter Drehung (und dabei erfolgender Änderung der Quartärstruktur) zustande kommen. Mit letzter, absoluter Sicherheit kann dies erst durch eine Röntgenstrukturanalyse geklärt werden.

7 Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen an Rinderleberkatalase mit der Zielsetzung durchgeführt, offene proteinchemische und -physikalische Fragen zur Struktur und Heterogenität dieses Enzyms zu klären. Im einzelnen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Die Reindarstellung von Kat1 und Kat5 gelang durch Ionenaustauschchromatographie. Beide Spezies zeigten fast gleiche spezifische Aktivität, es traten jedoch deutliche Unterschiede im elektrophoretischen Verhalten (Acrylamidgelelektrophorese) auf.

   Mittels isoelektrischer Fokussierung konnte gezeigt werden, daß sich die isoelektrischen Punkte von Kat1 und Kat5 um 0,95 pH-Einheiten unterschieden.

   Eine quantitative Aussage über die Oberflächenladungen und damit eine Erklärung für das unterschiedliche chromatographische und elektrophoretische Verhalten beider Spezies gewährte die Methode der trägerfreien Elektrophorese. Bei pH 8,5 hatte Kat5 eine um 12,7 % höhere negative Ladung als Kat1.

2. Völlige Übereinstimmung zeigten Kat1 und Kat5 hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrer tryptischen Peptide. Darüber hinaus konnte bei beiden Proteinen das Fehlen von Kohlehydraten bewiesen werden. Die Abwesenheit von Lipiden wurde durch die erzielten Ergebnisse sehr wahrscheinlich.

3. Trotz der aufgeführten Gemeinsamkeiten zeigte das heterogene elektrophoretische Verhalten der mit 8 M Harnstoff aufgefalteten Untereinheiten, daß Kat1 und Kat5 zwar aus den gleichen Polypeptidketten aufgebaut sind, daß diese jedoch untereinander nicht identisch sind. Dies konnte auf Ladungsunterschiede der Polypeptidketten und damit auf unterschiedliche Aminosäurekomposition zurückgeführt werden, da sich die Kettenlängen der Untereinheiten als gleich groß erwiesen. Dieses Ergebnis und die Bestimmung des Molekulargewichtes der Untereinheiten zu 60.000 wurden durch Gelfiltration bzw. SDS-Elektrophorese erzielt. Die von einigen Autoren angeblich gefundene Dissoziation von Rinderleberkatalase in Polypeptidketten erheblich höheren oder niedereren Molekulargewichtes wurde widerlegt.

Durch Hybridisierung von Kat1 mit Kat5 konnte bewiesen werden, daß Rinderleberkatalase aus 4 Untereinheiten mit dem oben beschriebenen Molekulargewicht von 60.000 besteht.

4. Kat1 und Kat5 waren ineinander und in die drei anderen Spezies sowohl durch das Einwirken geeigneter chemischer Agenzien als auch durch bloße Ionenaustauschchromatographie überführbar. Dieses Verhalten widerlegte die Erklärung der Heterogenität von Rinderleberkatalase auf das Basis von Isoenzymen in eindeutiger Weise.

5. Mit spezifischen Reagenzien wurde gezeigt, daß Kat1 6 Tyrosine und 4,4 Lysine mehr an der Moleküloberfläche hat als Kat5, während der Gehalt an Sulfhydrylgruppen gleich war.

Die Analyse der "verborgenen" SH-Gruppen ergab jedoch für Kat1 4 Thiolgruppen weniger - entsprechend 2 zusätzlichen Disulfidbrücken - als für Kat5.

Die vollständige Dissoziierbarkeit in die kleinsten kovalent gebundenen chemischen Einheiten beider untersuchter Rinderleberkatalasen mit SDS bewies das Fehlen von Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten.

6. Messungen des Circulardichroismus und der Optischen Rotationsdispersion zum Vergleich der Kettenkonformation brachten für Kat1 und Kat5 identische Werte, welche jedoch nur halb so groß waren wie die von einem Autor für undefinierte (bezüglich der 5 verschiedenen Spezies) Rinderleberkatalase angegebenen. Diese Diskrepanz konnte durch Messungen an selbst aus Rinderleber isolierter Katalase zugunsten der eigenen Werte entschieden werden. Aus diesen ließ sich ein α-Helixgehalt von 24 - 27 % errechnen.

7. Ein Vergleich der Absorptionsspektren von Kat1 und Kat5 zeigte deutliche Unterschiede im nahen UV, welche aufgrund der gleichen Primärstruktur beider Proteine auf Konformationsänderungen zurückgeführt werden konnten.

8. Eine Bestätigung dieser Tatsache wurde in den Ergebnissen der Röntgenkleinwinkelmessungen gefunden. Sowohl die Streumassenradien von Kat1 und Kat3 als auch besonders deren Molekülvolumina zeigten signifikante Unterschiede. Durch Anpassung der experimentell ermittelten Streukurven an theoretische Streukurven einfacher geometrischer Körper wurde festgestellt, daß die Moleküle der Rinderleberkatalase kugelähnlich sind. Die beste Streuäquivalenz zeigte ein elliptischer Zylinder. Diese Ergebnisse standen in sehr gutem Einklang mit den ebenfalls aus den Röntgenkleinwinkelmessungen bestimmten Anisotropiefaktoren und mit den elektronenoptischen Aufnahmen der Rinderleberkatalasemoleküle.

9. Ein Mechanismus zur Erklärung der Heterogenität von Rinderleberkatalase, basierend auf zweierlei Kettenkonformationen jeder der 4 Untereinheiten, bzw. auf unterschiedlicher Quartärstruktur der verschiedenen nativen Enzymspezies als Resultat einer Verdrehung von Untereinheiten im Molekül, und die daraus resultierenden Auswirkungen auf typische Proteinstrukturen, auf Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit der untersuchten Moleküle wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Lemberg, R., Legge, J. W., Hematin Compounds and Bile Pigments, New York: Interscience (1949) 415 - 444
2. Loew, O., U.S. Dept. Agr. Report No. 68 (1901) 47
3. Wolff, J., de Stoecklin, E., Compt. Rend. 151 (1910) 483
4. Sumner, J. B., Dounce, A. L., J. Biol. Chemistry 121 (1937) 417
5. Schnuchel, G., Z. physiol. Chem. 298 (1954) 16
6. Shirakawa, M., J. Agr. Chem. Soc. Japan, 23 (1950) 361
7. Stern, H. G., J. Biol. Chem. 112 (1936) 661
8. Greenfield, R. E., Price, V. E., J. Biol. Chem. 220 (1956) 607
9. Sumner, J. B., Gralén, N., J. Biol. Chem. 125 (1938) 33
10. Bonnichsen, R. K., Chance, B., Theorell, H., Acta chem. Scand. 1 (1947) 685
11. Keilin, D., Hartree, E. F., Biochem. J. 39 (1945) 293
12. Keilin, D., Hartree, E. F., Biochem. J. 60 (1955) 310
13. Bonnichsen, R. K., Acta chem. Scand. 6 (1952) 968
14. Tauber, H., Enzymologia 16 (1954) 311
15. Theorell, H., "The Enzymes II", 397, Academic Press (1951) New York
16. Chance, B., "The Enzymes II", 428, Academic Press (1951) New York
17. Chance, B., Fergusson, R. R., "The Mechanism of Enzyme Action " (1954) Baltimore
18. Keilin, D., Nichols, D., Biochim. Biophys. Acta 29 (1958) 302
19. Deisseroth, A., Dounce, A. L., Phys. Rev. 50 (1970) 319
20. Nicholls, P., Schonbaum, G. R., "The Enzymes" 8
21. de Duve, C., Baudhin, P., Phys. Rev. 46 (1966) 323
22. Chance, B., Science 116 (1952) 202

23. Nishimura, E. T., Hamilton, H. B., Kobara T. Y., Takahara, S., Ogura, Y., Doi, K., Science 130 (1959) 333

24. Kusai, K., Sekuzu, I., Hagihara, B., Okunuki, K., Yamauchi, S., Nakai, M., Biochim. Biophys. Acta 40 (1960) 555

25. Burton, K., "Methods in Enzymology II", 199, Academic Press (1955) New York

26. Price, V., Greenfield, R. E., J. Biol. Chem. 209 (1964) 363

27. Nishimura, E. T., Carson, S. N., Cobara, T. Y., Arch. Biochem. Biophys. 108 (1964) 452

28. Holmes, R. S., Masters, C. J., Arch. Biochem. Biophys. 109 (1965) 196

29. Holmes, R. S., Masters, C.J., Febs Letters 11 (1970) 45

30. Thorup, O. A., Carpenter, J. P., Howard, P., Br. J. Haemat. 10 (1964) 542

31. Cantz, M., Mörikofer-Zwez, S., Bossi, E., Kaufmann, H., v. Wartburg, J. P., Aebi, H., Experientia 24 (1968) 119

32. Mörikofer-Zwez, S., Cantz, M., Kaufmann, H., v. Wartburg, I. P., Aebi, H., European J. Biochem. 11 (1969) 49

33. Heidrich, H. G., Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 873

34. Heidrich, H. G., Hannig, K., Biochim. Biophys. Acta 168 (1968) 380

35. Bergmeyer, H. U., Biochem. Z. 327 (1955) 255

36. Shapiro, A. L., Vinuela, E., Maizel, J. V., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 815

37. Weber, K., Osborn, M., J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406

38. Laemmli, U. K., Nature 227 (1970) 680

39. Vesterberg, O., Svensson, H., Acta Chem. Scand. 20 (1966) 820

40. Svensson, H., Acta Chem. Scand. 15 (1961) 325

41. Haglund, H., Meth. Biochem. Anal. 19

42. Wiersema, P. H., J. Colloid Interface Sci. 22 (1966) 78

43. Hannig, K., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 338 (1964) 211

44. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., J. Biol. Chem. 193 (1951) 265

45. Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G., Z. Naturforschung 8 b (1953) 555

46. Layne, E., "Methods in Enzymology" 3 (1957) 450

47. Strauch, L., Z. Klin. Chem. 5 (1965) 165

48. Tanford, C., Lovrien, R., J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 1892

49. Samejima, T., Yang, J. T., J. Biol. Chem. 238 (1963) 3256

50. Agner, K., Biochem. J. 32 (1938) 1704

51. Chance, B., J. Biol. Chem. 151 (1943) 553

52. Zeile, K., Hellström, H., Z. Physiol. Chem. 192 (1930) 171

53. Tauber, H., Petit, E. L., J. Biol. Chem. 195 (1952) 703

54. Clamp, J. R., Dawson, G., Hough, L., Biochim. Biophys. Acta 148 (1967) 342

55. Bhatti, T., Chambers, R. E., Clamp, J. R., Biochim. Biophys. Acta 222 (1970)339

56. Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormich, J., Jones, R. T., Biochemistry 2 (1963) 992

57. Fields, R., Biochem. J. 124 (1971) 581

58. Ellman, G. L., Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70

59. Machleidt, W., Kerner, W., Otto, J., Z. Anal. Chem. 252 (1970) 151

60. Blackburn, "Amino Acid Determination", Marcel Dekker, INC., New York (1968) 128

61. Edelhoch, H., Biochemistry 6 (1967) 1948

62. Determann, H., "Gelchromatographie", Springer-Verlag (1967)

63. Ackers, G. K., Advan. Prot. Chem. 24 (1970) 343

64. Andrews, P., Biochem. J. 96 (1965) 595

65. Reynolds, J. A., Tanford, C., J. Biol. Chem. 245 (1970) 5161

66. Fish, W. W., Reynolds, J. A., Tanford, C., J. Biol. Chem. 245 (1970) 5166

67. Gratzer, W. B., "Poly-α-Aminoacids", Hersg. G. D. Fasman, Marcel Dekker, N. Y., 1 (1967) 177

68. Yang, J. T., "Poly-α-Aminoacids", 1 (1967) 239

69. Jirgensons, B., "Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules", Springer Verlag 1969

70. Beychock, S., "Poly-α-Aminoacids" 1 (1967) 293

71. Velluz, L., Legrand, M., Grosjean, M., "Optical Circular Dichroism", Verlag Chemie, Weinheim (Bergstr.) und Acad. Press, N. Y. (1965)

72. Simmons, N. S., Cohen, C., Szent-Györgyi, A. G., Wetlaufer, D. B., Blout, E. R., J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 4766

73. Klein, D., Yaguchi, M., Forster, J. F., Koffler, H., J. Biol. Chem. 243 (1968) 4931

74. Stapraus, I., Watanabe, S., J. Biol. Chem. 245 (1970) 5962

75. Straus, J. H., Gordon, A. S., Wallach, D. F. H., Europ. J. Biochem. 11 (1969) 201

76. Moffit, W., Yang, J. T., Proc. Nat. Acad. Sci. 42 (1956) 596

77. Wilcox, P. E., Federation Proc. 16 (1957) 270

78. Taniguchi, M., Biochim. Biophys. Acta 207 (1970) 240

79. Frank, B. H., J. Biol. Chem. 245 (1970) 3716

80. Mittelbach, P., Acta Physica Austriaca 19 (1964) 53

81. Kratky, O., "Progress in Biophysics" 13 (1963) 105

82. Kratky, O., Angew. Chemie 72 (1960) 467

83. Guinier, A., C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 204 (1937) 1115

84. Porod, G., Acta Physica Austriaca 2 (1948) 255

85. Mittelbach, P., Porod, G., Acta Physica Austriaca 14 (1961) 185

86. Mittelbach, P., Porod, G., Acta Physica Austriaca 14 (1961) 405

87. Mittelbach, P., Porod, G., Acta Physica Austriaca 15 (1962) 122

88. Porod, G., Kolloid-Z. 124 (1951) 83

89. Kratky, O., Z. Elektrochemie 58 (1954) 49

90. Stöckel, Diplomarbeit (1971), TU München

91. Conrad, H., Diplomarbeit (1967), TU München

92. Kratky, O., Porod, G., Skala, Z., Acta Physica Austriaca 13 (1960) 76

93. Hoßfeld, F., Dissertation (1967), TH Aachen

94. Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Olson, B. M., Biochim. Biophys. Acta 89 (1964) 47

95. Glossmann, H., Bode, W., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352 (1971) 132

96. Ullmann, A., Goldberg, M. E., Perrin, D., Monod, J., Biochemistry 7 (1968) 261

97. Seery, V. L., Fischer, E. H., Teller, D. C., Biochemistry 6 (1967) 3315

98. Tanford, C., Kawahara, K., Lapanje, S., J. Amer. Chem. Soc. 89 (1967) 729

99. Steinmetz, M. A., Deal, W. C., Biochemistry 5 (1966)1399

100. Kanarek, L., Marler, E., Bradshaw, R. A., Fellows, R. E., Hill, R. L., J. Biol. Chem. 239 (1964) 4207

101. Castellino, F. J., Barker, R., Biochemistry 7 (1968) 2207

102. Branden, C. J., Arch. Biochem. Biophys. 112 (1965) 215

103. Kawahara, K., Tanford, C., Biochemistry 5 (1966) 1578

104. Morse, D. E., Chan, W., Horecker, B. L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58 (1967) 628

105. Sund, H., Weber, K., Mölbert, E., European J. Biochem. 1 (1967) 400

106. Stapraus, I., Watanabe, S., J. Biol. Chem. 245 (1970) 5962

107. Samejima, T. Mc Cabe, Yang, J. T., Arch. Biochem. Biophys. 127 (1968) 354

108. Conrad, H., Mayer, A., Schwaiger, S., Schneider, R., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 845

109. Schelten, J., Mayer, A., Schmatz, W., Hoßfeld, F., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 851

110. Muirhead, H., Perutz, M. F., Nature (London) 199 (1963) 633

111. Perutz, M. F., Bolton, W., Diamond, R., Muirhead, H., Watson, H. C., Nature (London) 203 (1964) 687

112. Muirhead, H., Cox, J. M., Mazzarella, L., Perutz, M. F., J. Mol. Biol. 28 (1967) 117

113. Mittelbach, P., Porod, G., Acta Physica Austriaca 19 (1964) 53

114. Mittelbach, P., Porod, G., Acta Physica Austriaca 15 (1962) 122

115. Mittelbach, P., Porod, G., Acta Physica Austriaca 14 (1961) 405

116. Schroeder, W. A., Saha, A., Fenninger, W. D., Cua, J. T. Biochim. Biophys. Acta 58 (1962) 611

117. Dunker, A. K., Rueckert, R. R., J. Biol. Chem. 244 (1969) 5074

118. Swank, R. T., Munkres, K. D., Anal. Biochem. 39 (1971) 462

119. Lesnaw, J. A., Reichmann, M. E., Virology 42 (1970) 724

120. Timpl, R., MPI für Eiweiß- und Lederforschung, München, persönliche Mitteilung

121. Russel, W. C., MRC Mill Hill, London, persönliche Mitteilung

122. Maizel, J. V., "Fundamental Techniques in Virology", Hersg. K. Habel, N. Salzman, Acad. Press (1969) 354

123. Hiraga, M., Abe, K., Anan, F. K., The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University 14 (1967) 293

124. Hänisch, G., Dissertation (1970) TU München

125. Samejima, T., Kita, M., Biochim. Biophys. Acta 175 (1969) 24

126. Margoliash, E., Schejter, A., J. Biol. Chem. 237 (1962) 2359

127. Samejima, T., J. Biochem. Japan 46 (1959) 155

128. Samejima, T., Shibata, K., Arch. Biochem. Biophys. 93 (1961) 407

129. Valentine, R. C., Nature 204 (1965) 1262

130. Shaw, D. J., "Electrophoresis" Academic Press London and New York, 1960

131. Schneider, R., Dissertation 1970, TU München

132. Deisseroth, A., Dounce, A. L., Arch. Biochem. Biophys. 120 (1967) 671

133. Schroeder, W. A., Saha, A., Fenninger, W. D., Cua, J. T., Biochim. Biophys. Acta 58 (1962) 611

134. Krietsch, K. G., Pentchev, P. G., Machleidt, W., Klingenburg, H., Febs Letters 11 (1970) 137

135. Hilse, K., Popp, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61 (1968) 930

136. Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, R. J., Shelton, J. B., Kleihauer, E. F., Dozy, A. M., Robberson, B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 60 (1968) 537

137. Sumner, B., Somers, F., "Chemistry and Methods of Enzymes", Acad. Press, New York, 208 (1947)

138. Bode, W., Dissertation (1971) Universität München

Lebenslauf

Name:	Günter Kuntz
Geburtstag:	11. 9. 1941
Geburtsort:	München
Religion:	rk
Elternnamen:	Willi Kuntz; Jula, geb. Streb
Beruf des Vaters:	Buchhalter
Schulbildung:	Besuch der Volksschule "Schule an der Schulstraße" in München von September 1947 bis Juli 1952. Besuch der "Rupprecht-Oberreal-Schule" in München von September 1952 bis Juli 1961.
Hochschulbildung:	Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der Universität München im Wintersemester 1962/63. Ablegung des Vorexamens am 3. Mai 1966 in München. Ablegung des Staatsexamens am 14. März 1969 in München. Beginn der Promotion im April 1969 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München.